
BACHELORARBEIT

Frau
Kristin Scharf

BI11w1-B

**Optimierung des Screenings von
β-hämolysierenden Streptokokken**

Mittweida, 2014

Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/
Informatik

BACHELORARBEIT

Optimierung des Screenings von β -hämolysierenden Streptokokken

Autor:
Frau

Kristin Scharf

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI11w1-B

Erstprüfer:
Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Frau Dr. rer. nat. Simone Geyer

Einreichung:
Mittweida, 08.08.2014

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2014

Faculty Mathematics/ Sciences/ Computer Science

BACHELOR THESIS

Optimization of the screening of β -haemolytic streptococci

author:

Ms.

Kristin Scharf

course of studies:

Biotechnology/Bioinformatics

seminar group:

BI11w1-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

second examiner:

Dr. rer. nat. Simone Geyer

submission:

Mittweida, 08.08.2014

defence/ evaluation:

Mittweida, 2014

Bibliographische Beschreibung:

Scharf, Kristin: Optimierung des Screenings von β -hämolysierenden Streptokokken. - 2014. - XI, 53, XII S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2014

Englischer Titel

Optimization of the screening of β -haemolytic streptococci

Kurzbeschreibung:

In dieser Arbeit wurden vier feste chromogene Nährmedien auf den Nachweis von β -hämolysierenden Streptokokken der Gruppe B (GBS) untersucht: CHROMagarTM StrepB (Mast Diagnostica), GranadaTM- (bioMérieux), *Brilliance* GBS- (Oxoid) und StrepB *Select*-Agar (Bio-Rad). Zusätzlich wurden zwei Bouillons getestet: GranadaTM Bouillon (bioMérieux) und GBS-Medium (medco Diagnostika GmbH). Die Nährmedien und Bouillons wurden hinsichtlich der Nachweisgrenze, Selektivität, Sensitivität und Spezifität verglichen. Ein bluthaltiges Selektivnährmedium (CNA-Agar) diente als Referenzmethode. Mittels VITEK 2-System (bioMérieux) und WalkAway-System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH) wurden von den nachgewiesenen *Streptococcus agalactiae* Stämmen die dazugehörigen Antibiogramme erstellt.

Es konnten 316 Patientenproben mittels der Referenzmethode (CNA-Agar) auf β -hämolysierende Streptokokken der Gruppe B untersucht werden. Davon wurden 28 Proben als positiv detektiert. Auf dem CHROMagarTM StrepB konnten auf sieben von 68 Proben ein Wachstum von *S. agalactiae* nachgewiesen werden. Eine Probe lieferte ein falsch negatives Ergebnis. Von 47 Proben konnte der GranadaTM Agar eine Probe als positiv detektieren. Der *Brilliance* GBS Agar konnten 15 von 29 Proben als positiv detektieren. Von 33 Proben lieferten 15 Proben einen positiven Nachweis auf dem StrepB *Select* Agar. Dieses Nährmedium lieferte drei falsch negative Resultate.

Die Antibiogramme wurden sowohl mit dem VITEK 2-System (Resistenztestkarte: AST-ST01) als auch mit dem WalkAway-System (MICroSTREP *plus* Panel) von den insgesamt 28 positiv detektierten Proben erstellt. Beide Systeme konnten vergleichbare Resultate liefern.

Danksagung

Diese Bachelorarbeit wurde im Sommersemester 2014 verfasst und dient als Abschlussarbeit für mein Bachelorstudium Biotechnologie/Bioinformatik an der Hochschule Mittweida. Durch die Zusammenarbeit mit der mikrobiologischen Abteilung des Diagnosticums in Neukirchen konnte ich diese Bachelorarbeit verwirklichen. Das Kollegium, unter der Führung von Herrn Dr. rer. nat. S. Scholz und Frau Dr. rer. nat. U. Grimmer, besitzt eine vorbildliche Arbeitseinstellung und einen sehr guten Teamgeist. Somit bot sich mir eine optimale Arbeitsumgebung. Hiermit bedanke ich mich, für das entgegengebrachte Vertrauen und die große Hilfsbereitschaft bei der mikrobiologischen Abteilung. Frau Dr. rer. nat. Simone Geyer, meine Betreuerin im Diagnosticum, möchte ich einen besonderen Dank aussprechen, da sie mir jederzeit mit fachlichem Rat, Hilfestellungen und Verbesserungsvorschlägen zur Seite stand. Durch ihre Hilfe war es mir möglich, die notwendigen Kontakte für eine erfolgreiche Zusammenarbeit zu knüpfen und alle mir zur Verfügung stehenden Ressourcen zu nutzen.

Ein weiterer Dank, gilt meiner Betreuerin von der Hochschule Mittweida, Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus. Durch ihre fachlichen Ratschläge war sie mir eine große Hilfe, bei der Erstellung meiner Bachelorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Ziel der Arbeit	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Der Keim <i>Streptococcus agalactiae</i>	2
2.2 Resistenzmechanismen	3
2.3 Keimidentifizierung mittels MALDI TOF MS.....	5
2.4 Nährmedien mit chromogenem Substrat	6
2.4.1 CHROMagar™ StrepB von Mast Diagnostica.....	7
2.4.2 Granada™ Agar und Granada™ Bouillon biphasisch von bioMérieux.....	8
2.4.3 <i>Brilliance</i> GBS Agar von Oxoid.....	9
2.4.4 StrepB <i>Select</i> Medium von Bio-Rad.....	10
2.4.5 GBS-Medium von medco Diagnostika GmbH.....	11
3 Material.....	12
3.1 Chemikalien	12
3.2 Medien	12
3.3 Bakterienstämme	13
3.4 Software	14
3.5 Geräte und Zubehör	14
4 Methoden	16
4.1 Ermittlung der Nachweisgrenze.....	16
4.2 Testung der chromogenen Nährmedien	17
4.2.1 Selektivität	17
4.2.2 Verwendung von Patientenproben.....	19
4.3 Keimidentifizierung	19
4.4 Resistenztestung.....	20
4.4.1 VITEK 2-System	20
4.4.2 WalkAway-System	22
5 Ergebnisse.....	25

5.1 Resistenzstatistik 2013 und 2014.....	25
5.2 Ermittlung der Nachweisgrenze.....	27
5.3 Testung der chromogenen Nährmedien	30
6 Diskussion	42
6.1 Vergleich der Resistenzstatistik von 2013 mit 2014	42
6.2 Auswertung der chromogenen Nährmedien	43
6.2.1 Nachweisgrenze	43
6.2.2 Qualität der Nährmedien.....	44
6.3 Vergleich der beiden Resistenztestungen	48
6.4 Vorschlag zum Screening von β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe B 49	
7 Zusammenfassung und Ausblick.....	52
Literaturverzeichnis	VII
Anhang.....	XII
Selbstständigkeitserklärung.....	XXIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von 6-Aminopencillansäure und Penicillin G.....	4
Abbildung 2: CHROMagar™ StrepB [URL - 1].....	7
Abbildung 3: Granada™ Bouillon [URL - 4].....	8
Abbildung 4: Granada™ Agar [URL - 3].....	9
Abbildung 5: <i>Brilliance</i> GBS Agar [URL - 5]	10
Abbildung 6: StrepB <i>Select</i> Medium [URL - 6]	10
Abbildung 7: GBS-Medium [URL - 7].....	11
Abbildung 8: Keimidentifizierung mittels MALDI TOF MS	20
Abbildung 9: VITEK 2-System	22
Abbildung 10: WalkAway-System	23
Abbildung 11: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) der B- Streptokokken (n = 290) für den Zeitraum vom 01.01.2014 bis 30.06.2014	25
Abbildung 12: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach CLSI) der B-Streptokokken (n = 553) für den Zeitraum vom 01.01.2013 bis 31.12.2013.....	26
Abbildung 13: <i>Streptococcus agalactiae</i> nach 24h Inkubation	27
Abbildung 14: Resistenzstatistik von B-Streptokokken von Clindamycin, Erythromycin und Penicillin	42
Abbildung 15: Vorschlag zum Arbeitsablauf bei Anforderung auf β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	12
Tabelle 2: Nährmedien.....	12
Tabelle 3: Bakterienstämme	13
Tabelle 4: Software	14
Tabelle 5: Geräte und Zubehör	14
Tabelle 6: Übersicht zu den getesteten Organismen auf den verschiedenen Nährmedien	18
Tabelle 7: Antibiotika der VITEK 2-Resistenzkarte AST-ST01	21
Tabelle 8: Antibiotika des Panels MICroSTREP <i>plus</i>	24
Tabelle 9: Ermittlung der Nachweisgrenze der getesteten Nährmedien.....	29
Tabelle 10: Selektivität der Nährmedien	31
Tabelle 11: Übersicht der Patientenproben.....	32
Tabelle 12: Nachweis und Resistenztestung positiver Patientenproben.....	34
Tabelle 13: Sensitivität und Spezifität der festen chromogenen Nährmedien.....	46
Tabelle 14: Validation MICroSTREP <i>plus</i> Panel WalkAway	XII

Abkürzungsverzeichnis

AM	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection (amerikanische Stammsammlung)
Azi	Azithromycin
C	Chloramphenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Institute für klinische und Labor-Standards)
CNA-Agar	Columbia- Colistin Nalidixinsäure-Agar + 5% Schafblut
COS-Agar	Columbia-Agar + 5% Schafblut
CM (Cd)	Clindamycin
CRO	Ceftriaxone
CTX	Cefotaxime
E	Erythromycin
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Europäisches Komitee für antimikrobielle Empfindlichkeitsbestimmung)
GBS	Streptokokken der serologischen Gruppe B nach Lancefield-Einteilung
ICR	Induzierte Clindamycin Resistenz
ID	Identifikation
KBE	koloniebildende Einheiten
LEV (Lvx)	Levofloxacin
LHB-Bouillon	Müller-Hinton-Bouillon + 3% Pferdeblut
LNZ	Linezolid

MALDI TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry (matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation – Flugzeit – Massenspektrometrie)
MCF	McFarland
MHK	Minimale Hemmkonzentration
mRNA	messenger ribonucleic acid (ribosomale-Ribonukleinsäure)
P	Benzylpenicillin
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
SXT (T/S)	Trimethoprim/Sulfamethoxazole
TE	Tetracyclin
TSS-Agar	Trypton-Soja-Agar + 5% Schafblut
VA	Vancomycin

1 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen verschiedene chromogene Nährmedien zum Nachweis von β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B (GBS) untersucht werden. Ziel ist es einen geeigneten Untersuchungsablauf zum schnellen und sicheren Nachweis von *S. agalactiae* im mikrobiologischen Routinelabor des Diagnosticums in Neukirchen zu entwickeln. Der Keim *Streptococcus agalactiae* ist vor allem bei Schwangeren von Bedeutung, da während der Geburt eine Übertragung auf das Neugeborene erfolgen und dort unter Umständen eine Erkrankung auslösen kann.

Es sollen vier feste chromogene Nährmedien und zwei Bouillons untersucht werden: CHROMagarTM StrepB (Mast Diagnostica), GranadaTM- (bioMérieux), *Brilliance* GBS- (Oxoid) und StrepB *Select*-Agar (Bio-Rad). GranadaTM Bouillon (bioMérieux) und GBS-Medium (medco Diagnostika GmbH) waren die geprüften Bouillons. Die Nährmedien und Bouillons sollen hinsichtlich der Nachweisgrenze, Selektivität, Sensitivität und Spezifität verglichen werden.

Mittels VITEK 2-System (bioMérieux) und WalkAway-System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH) sollen von den nachgewiesenen *Streptococcus agalactiae* Stämmen die dazugehörigen Antibiotogramme erstellt werden

2 Einleitung

2.1 Der Keim *Streptococcus agalactiae*

Die Familie der *Streptococcaceae* sind Oxidase- und Katalase-negative, grampositive, unbewegliche Kokken, die keine Sporen bilden [Neumeister *et al.*, 2009]. Mikroskopisch stellen sie sich meistens in Kettenform dar. Die Gattung *Streptococcus* ist besonders in der medizinischen Mikrobiologie von Bedeutung. Eine Unterteilung kann hinsichtlich des Hämolyseverhaltens unternommen werden. Dabei werden α -, β - und γ -hämolisierende Streptokokken unterschieden. Bei der β -Hämolyse wird Hämoglobin abgebaut und zu Bilirubin umgewandelt [Fuchs *et al.*, 2007]. Dabei werden die Erythrozyten durch die Zerstörung der Zellmembran aufgelöst. Diese Streptokokken bilden *in vitro* auf einem bluthaltigen Nährmedium eine durchscheinende Zone [Neumeister *et al.*, 2009]. Die β -hämolisierenden Streptokokken lassen sich aufgrund des Lancefield-Antigens (ein in der Zellwand vorkommendes Polysaccharid) in unterschiedliche Gruppen einteilen [Neumeister *et al.*, 2009]. *Streptococcus agalactiae* gehört zu der Gruppe B.

Streptococcus agalactiae kann Infektionskrankheiten auslösen und kommt vor allem in den Schleimhäuten von Darm- und Urogenitaltrakt sowie im Rachen vor [Neumeister *et al.*, 2009]. Für die meisten Erwachsenen sind die B-Streptokokken nicht pathogen. Jedoch kann es bei der Geburt vorkommen, dass der Fötus sich mit dem Keim infiziert. Nach der Infizierung wird zwischen der „Early-Onset“-Form und „Late-Onset“-Form unterschieden. Bei der „Early-Onset“-Form erfolgt eine Erkrankung unmittelbar in der ersten Lebenswoche. Meist erkranken die Babys an Pneumonie oder Sepsis. Erfolgt die Erkrankung erst in den darauf folgenden Wochen, wird von der „Late-Onset“-Form gesprochen. In Deutschland liegt die Häufigkeit für eine auftretende Erkrankung bei 0,5 pro 1000 Lebendgeburten und die Sterblichkeit liegt bei 5 %. Andere Auswirkungen für eine Infektion mit den B-Streptokokken können sein: Nabelentzündung, Otitis, Abszess oder Osteomyelitis. Bei immungeschwächten Patienten kann eine Infektion mit *Streptococcus agalactiae* zu Bakteriämie oder Pyelonephritis führen. [URL - 2]

Deshalb wird eine Untersuchung hinsichtlich der B-Streptokokken besonders bei schwangeren Frauen empfohlen. Das Screening wird zwischen der 35. und 37. Schwangerschaftswoche durchgeführt [Stille *et al.*, 2013]. Hierbei entnimmt der Arzt einen Abstrich aus dem Vaginal- und Rektalbereich und sendet diese Probe in einem entsprechenden Transportmedium an ein Fachlabor zur Untersuchung auf *Streptococcus agalactiae* [MiQ 2011]. Der Nachweis und die anschließende Resistenztestung dauern in der Regel 2 - 3 Tage.

Bei einem Nachweis des Erregers kann eine Behandlung kurz vor der Geburt erfolgen. Penicillin ist das Mittel der Wahl. Sollte die schwangere Patientin eine Penicillinallergie haben, gelten als Reserveantibiotika Clindamycin und Cefazolin. Clindamycin wird während der Stillzeit nicht verabreicht, da es Benzylalkohol enthält und schwere Atemstörungen bei dem Neugeborenen auslösen kann. [Stille *et al.*, 2013]

2.2 Resistenzmechanismen

Bakterien können Resistenzen gegenüber Antibiotika ausbilden, indem sie sich an die veränderten Umweltbedingungen anpassen. Es wird zwischen zwei Arten von Resistenzen unterschieden: die primäre und die sekundäre Antibiotikaresistenz. Besitzt eine Gattung oder eine Art eine natürliche Wirkungslücke gegenüber einem bestimmten Antibiotikum, wird von der primären Antibiotikaresistenz gesprochen. Bei der sekundären Antibiotikaresistenz entwickelt das Bakterium eine Resistenz, sodass das vorerst wirksame Antibiotikum seine Wirkung verliert. Dies geschieht zum Beispiel durch Mutationen oder Übertragung von Plasmiden, die entsprechende Resistenzgene tragen. [Stille *et al.*, 2013]

Das Mittel der Wahl bei der Behandlung von B-Streptokokken stellt Penicillin G (Benzylpenicillin) dar. Dabei handelt es sich um ein β -Lactam-Antibiotikum, welches von dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* produziert wird. Es hemmt die Peptidoglykansynthese in der Zellwand der Bakterien und ist ein Derivat der 6-Aminopenicillansäure. Penicillin G besitzt die stärkste Aktivität gegenüber grampositiven Keimen, ist jedoch sehr anfällig für Betalaktamasen. Diese bakteriellen Betalaktamasen können durch eine Hydrolyse das Antibiotikum unwirksam machen. [Stille *et al.*, 2013]

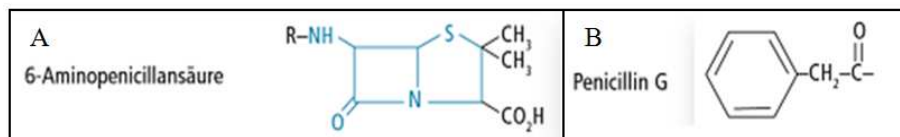


Abbildung 1: Chemische Struktur von 6-Aminopenicillansäure und Penicillin G

An die Aminogruppe (A) können unterschiedliche saure Radikale (R) gebunden werden, dadurch entstehen die unterschiedlichen Penicillinarten. Bei Penicillin G bindet das in B abgebildete Radikal an die 6-Aminopenicillansäure. [Stille *et al.*, 2013]

Clindamycin wird oft neben Penicillin bei der Behandlung von *Streptococcus agalactiae* verwendet. Dabei kann es bei Erythromycin resistenten Streptokokken zu einer Clindamycin-Resistenz, während der Schwangerschaft kommen. Clindamycin ist ein halbsynthetisches Derivat von Lincosamid und hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese im Bereich des Peptidyl-Transferase-Zentrums [Stille *et al.*, 2013]. Dieses Transferase-Zentrum befindet sich innerhalb der 50S-Untereinheit in dem bakteriellen Ribosom [URL - 6]. Somit wird die Translation der mRNA unterbunden [URL - 6]. Erythromycin bildet einen makrozyklischen Lacton-Ring und wird oft als unterschiedliches Derivat therapeutisch verwendet [Stille *et al.*, 2013]. Der makrozyklische Lacton-Ring bindet an der 23S-rRNA an den Nukleotiden A2058 und A2059 der Domäne V [URL - 6]. Dabei kommt es zu der Blockierung des Peptid-Exit-Channels der ribosomalen 50S-Untereinheit [URL - 6]. Die Makrolide verhindern somit einen Wiederaufbau einer neuen 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms [URL - 6].

In vitro kann ein Antagonismus zwischen den beiden Medikamenten auftreten und zu einer Kreuzresistenz zwischen Erythromycin und Clindamycin führen. An dem Nukleotid A2058 innerhalb der 50S-Untereinheit erfolgt eine Methylierung, sodass es zu einer Konformationsänderung der 23S-rRNA kommt. Nun kann das Erythromycin nicht mehr binden. Da sich die ribosomalen Bindungsstellen überlappen, wird auch die Bindung von Lincosamiden beeinträchtigt. Bei der induzierbaren Clindamycin-Resistenz wird eine inaktive mRNA gebildet. Diese wird erst aktiv, wenn ein Induktor vorhanden ist und die Produktion der Methylase erlaubt. [URL - 6]

In der Laborroutine werden die Antibiotikaempfindlichkeiten zum Beispiel mit Hilfe der minimalen Hemm-Konzentration (MHK) *in vitro* ermittelt. Diese stellt die geringste

Konzentration einer Substanz dar, bei der das Wachstum von Mikroorganismen gerade noch gehemmt wird. Die automatisierte Erstellung von Antibiotogrammen können u.a. mittels VITEK 2-System (bioMérieux) oder WalkAway-System (Siemens Healthcare) erfolgen.

Bei dem VITEK 2-System werden Resistenztestkarten verwendet, welche 64 Küvetten enthalten. Diese Küvetten beinhalten unterschiedliche Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen. Über einen Schlauch wird automatisch die Bakteriensuspension in die einzelnen Küvetten angesaugt. Das VITEK 2-System misst photometrisch die Trübung in den einzelnen Küvetten während der Inkubationszeit. Eine Trübung in einer Küvette zeigt das Erregerwachstum an. Dies bedeutet eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum bei dieser Konzentration. Wird keine Trübung festgestellt, wächst dieses Bakterium nicht in dieser Küvette und ist somit sensibel gegenüber dem Antibiotikum bei dieser Konzentration. [URL - 9]

Bei dem WalkAway-System werden Panels verwendet. Die Panels enthalten Trays mit unterschiedlichen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen. Diese Antibiotika werden mit Wasser oder Puffer auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt, um den klinisch relevanten Bereich abzudecken. Die Panels werden mit der Bakteriensuspension von Hand rehydriert und nach 20 - 24h CO₂-freier Inkubation wird die minimale Hemm-Konzentration bestimmt. [URL - 10]

2.3 Keimidentifizierung mittels MALDI TOF MS

Die matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) ist ein Verfahren, welches bei der Massenspektrometrie angewendet wird, um Moleküle zu ionisieren. Zu Beginn wird die Desorption mittels eines UV-Laserstrahls ausgelöst. Dies erfolgt durch hochenergetische Laserimpulse, und da das Matrixmaterial UV-Licht absorbiert, kommt es zur Abtragung der oberen Matrixschicht. Dabei wird eine Wolke erzeugt, welche nun unterschiedliche Molekülarten enthält: neutrale und ionisierte, protonierte und deprotonierte Matrixmoleküle, Matrixcluster und Nanotröpfchen. Danach werden diese unterschiedlichen Moleküle ionisiert. Dabei muss beachtet werden, dass eine Reinkultur der zu analysierenden Probe entnommen wurde, um eine möglichst genaue Identifizierung mittels MALDI TOF MS durchzuführen. [Fuchs, 2012]

Für die Matrix werden organische Komponenten verwendet, welche UV-Licht absorbieren können und eine Säurefunktion besitzen. Oft wird die α -Cyano-4-hydroxymizinsäure verwendet. Die Matrixmoleküle sollten ein geringes Molekulargewicht besitzen, um ein leichtes Eindampfen zu ermöglichen. Gleichzeitig sollten sie jedoch auch groß genug sein und einen geringen Dampfdruck haben, damit die Matrix nicht verdampft, wenn die Probe eingebracht wird bzw. wenn diese dann im Spektrometer steht. Des Weiteren sollte ihr pH-Wert niedrig sein, um die Protonenquelle zu bilden und um die Ionisation fördern zu können. Besitzt die Matrix eine starke optische Absorption im UV- oder Infrarot-Bereich, kann sie die Laserstrahlen schnell und effizient absorbieren. Auf einem Target wird die Probe und Matrix aufgetragen. Das Lösungsmittel verdampft bei Raumtemperatur. Nun beginnt die Co-Kristallisation. Dieser Schritt ist besonders wichtig, denn hierbei werden die Analysemoleküle in die Kristalle der Matrix eingebaut. Ein sehr gutes Spektrogramm zeichnet sich durch eine gut gewählte Matrix und den gleichmäßigen Einbau der Analyte in die Kristalle aus. [URL - 12]

Das Flugzeitmassenspektrometer (engl. time-of-flight mass spectrometer, TOF MS) wird bei MALDI TOF MS verwendet, da es schnelle Messungen erlaubt und keine Einschränkungen hinsichtlich des Massebereiches notwendig sind. Hierbei wird mithilfe der Dauer der Flugzeit das Masse/Ladungsverhältnisses bestimmt. Die in dem elektrischen Feld, beschleunigten Ionen (Ladung q) durchlaufen eine genau definierte Flugstrecke. Daraus lässt sich die Energie bestimmen, welche die Ionen aufgenommen haben und die T_f ermitteln: $T(f) \propto \sqrt{(m/q)}$. Dabei gilt: Je höher die Spannung, umso weniger Zeit wird benötigt. Der Detektor misst den Zeitpunkt für das Eintreffen der Ionen. Somit kann er die genaue Flugzeit bestimmen. Das ankommende Signal wird umgewandelt und in einem Spektrum dargestellt. [URL - 11]

2.4 Nährmedien mit chromogenem Substrat

Nährmedien können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Oft verwendet wird die Einteilung nach Selektivmedien oder Differentialmedien, aber es gibt auch selektive Differentialmedien. Diesen Medien können auch noch chromogene Substrate zugesetzt werden, sodass diese bei dem Wachstum eines bestimmten Keims eine

Farbreaktion auslösen. Diese Erreger können somit schnell vorselektiert werden, um diese dann mit herkömmlichen Identifizierungsmethoden zu bestätigen [Perry & Freydière, 2007]. Die chromogenen Substrate bestehen meist aus Kohlehydraten, Aminosäuren, Phosphaten oder anderen Substanzen, an welche Chromophore gebunden sind [Neumeister *et al.*, 2009]. Dazu muss beachtet werden, dass diese Substanzen möglichst spezifisch ausgewählt werden, um eine genaue Identifizierung zu erhalten. Die meist farblosen Chromophore werden von dem zu identifizierenden Mikroorganismus enzymatisch abgespalten und die entstandenen Produkte färben danach die Kolonie charakteristisch an [Neumeister *et al.*, 2009]. Somit können vor allem bei Mischkulturen relevante Keime identifiziert werden und für Routinelabore kann eine einfachere Handhabung geboten werden.

2.4.1 CHROMagarTM StrepB von Mast Diagnostica

Das chromogene Nährmedium von Mast Diagnostica (siehe Abbildung 2) eignet sich zur Isolierung und Differenzierung von B-Streptokokken. Dabei ist es nicht relevant, ob diese Erreger aus einem Vaginalabstrich einer schwangeren Frau entnommen worden sind oder von anderen Körperregionen immungeschwächter Patienten. Dieses Medium besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität, die genauen Zahlenwerte sind laut Packungsbeilage nicht bekannt.

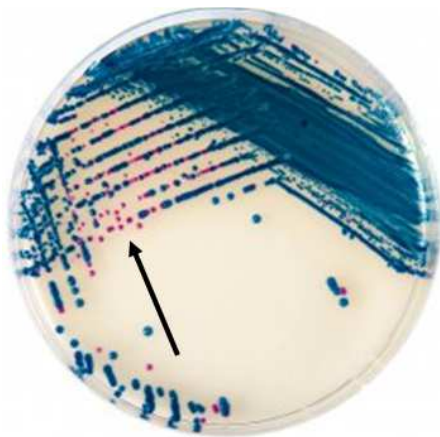


Abbildung 2: CHROMagarTM StrepB [URL - 1]

Der Keim *Streptococcus agalactiae* bildet auf dem CHROMagarTM StrepB von Mast Diagnostica malvenfarbige Kolonien (siehe Pfeil).

Auf diesem Medium wachsen B-Streptokokken laut Hersteller malvenfarbig. Andere Mikroorganismen wachsen blau oder werden inhibiert. Die Proben können direkt oder nach Anreicherung in Todd-Hewitt-Bouillon auf dem Nährmedium ausgestrichen werden. Als Inkubationszeit werden 18 - 24h bei 37°C ohne CO₂ angegeben. Diese Nährmedien können bei CO₂-Bebrütung zu falsch positiven Kulturen führen. Laut Hersteller wird empfohlen, die Medien nach 48h ein zweites Mal abzulesen, da seltene Streptokokken erst nach 48h malvenfarbige Kolonien bilden.

2.4.2 GranadaTM Agar und GranadaTM Bouillon biphasisch von bioMérieux

Beide Nährmedien von bioMérieux eignen sich als Selektivmedium zur Anzucht und Identifizierung von Streptokokken der Gruppe B. Dafür können Proben von schwangeren Frauen oder von Neugeborenen verwendet werden. Als Nährstoffbasis dienen Peptone, Pyruvate und Glukose. Mit den Substraten Methotrexat, Pferdeserum und Stärke kommt es laut Hersteller zu einer Bildung von orange-rot gefärbten Pigmenten bei hämolysierenden B-Streptokokken. Des Weiteren hemmt die Anwesenheit einer Antibiotikamischung die meisten gramnegativen Mikroorganismen und Hefen. Die Inkubation sollte 18 - 24h bei 35 ± 2°C (anaerob) betragen.

Bei der Bouillon (siehe Abbildung 3) können anovaginale Abstriche von schwangeren Patientinnen verwendet werden. Sollte nach 24h Inkubation ein Farbumschlag nach orange-rot erfolgt sein, wird diese Probe als positiv (Wachstum von *Streptococcus agalactiae*) betrachtet. Bei anderen Mikroorganismen kommt es zu keinem Farbumschlag nach der Inkubationszeit.



Abbildung 3: GranadaTM Bouillon [URL - 4]

Der Keim *Streptococcus agalactiae* bildet in der GranadaTM Bouillon von bioMérieux einen rot-orangen Farbumschlag.

Für den Agar (siehe Abbildung 4) können ebenso anovaginale Abstriche von schwangeren Patientinnen verwendet werden. Außerdem können Urinproben von schwangeren Frauen und aspirierter Magensaft von Neugeborenen untersucht werden. Diese Proben können laut Herstellerangaben direkt überimpft werden oder nach Anreicherung (in Todd Hewitt Bouillon). Nach 24h Inkubationszeit wachsen Streptokokken der Gruppe B als orange-rote Kolonien. Andere Mikroorganismen werden gehemmt oder bilden andersfarbige Kolonien aus. Nach Clark & Scopes liegt die Sensitivität des GranadaTM Agars bei 93,7% und die Spezifität bei 100% [URL - 8].

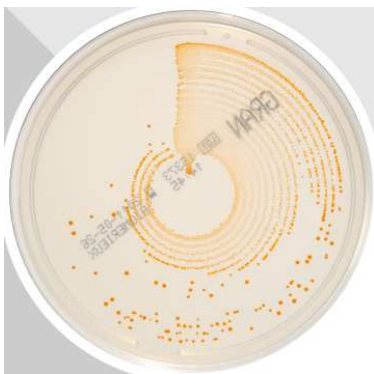


Abbildung 4: GranadaTM Agar [URL - 3]

Der Keim *Streptococcus agalactiae* bildet auf dem GranadaTM Agar von bioMérieux orange-rote Kolonien aus.

2.4.3 Brilliance GBS Agar von Oxoid

Dieses Nährmedium (siehe Abbildung 5) beinhaltet zwei Chromogene. *Streptococcus agalactiae* bildet eine Phosphatase aus. Diese ist in der Lage das erste Chromogen zu spalten und die Kolonie pink anzufärben. Dabei werden andere Mikroorganismen gehemmt oder bilden blaue bis dunkel violette Kolonien. Durch das zweite Chromogen wird diese Farbgebung hervorgerufen, sodass eine leichte Identifizierung möglich ist. Der GBS Agar enthält einen Antibiotika-Mix, welcher das Wachstum von *Enterobacteriaceae*, Staphylokokken, Enterokokken und D-Streptokokken hemmt und somit eine bessere Sensitivität und Spezifität erzielt (genauere Angaben sind laut Packungsbeilage nicht bekannt). Ein Antimykotikum hemmt das Wachstum von Hefen.



Abbildung 5: Brilliance GBS Agar [URL - 5]

Der Keim *Streptococcus agalactiae* bildet auf dem Brilliance GBS Agar von Oxoid pinke Kolonien aus.

Mit diesem Medium können B-Streptokokken detektiert werden, welche keine Hämolyse bilden. Die Ergebnisse liegen nach einer Inkubation von 18 - 24h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (aerob) vor.

2.4.4 StrepB Select Medium von Bio-Rad

Dieses selektive, chromogene Nährmedium auf Agarbasis dient zur Isolierung und Identifizierung von *Streptococcus agalactiae*. Dafür können Vaginal- oder Vaginalrektalproben benutzt werden. Diese können direkt oder nach Anreicherung beimpft werden. Das Wachstum wird laut Herstellerangaben durch eine bestimmte Zusammensetzung von Peptonen und Nährstoffen optimal gefördert. Dabei hemmt eine antibiotische und antimykotische Mischung das Wachstum vieler Mikroorganismen. Nicht gehemmt werden Streptokokken, einige Enterokokken und Laktobazillen. Durch den Zusatz mehrerer Chromogene können spezifische Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Diese führen zu einer charakteristischen Färbung von Bakterienkolonien: *Streptococcus agalactiae* bildet blaue Kolonien (siehe Abbildung 6), Enterokokken bilden rosa bis violette Kolonien und Laktobazillen kleine rosa Kolonien.



Abbildung 6: StrepB Select Medium [URL - 6]

Der Keim *Streptococcus agalactiae* bildet auf dem StrepB Select Medium von Bio-Rad blaue (türkisblau bis himmelblau) Kolonien aus.

Die Inkubationszeit beträgt 24 - 48 h bei 35 - 38°C (aerob). Sollte nach 24 h kein eindeutiges oder negatives Ergebnis vorliegen, sollte das Medium weitere 24h bebrütet werden. Außerdem sollte der klinische Hintergrund, die Probenherkunft und Morphologie (der Kolonie sowie der Mikroskopie) berücksichtigt werden.

Die Empfindlichkeit liegt bei 73% aus der Primärkultur und bei 96% nach Anreicherung nach 48h Inkubation. Laut Herstellerangaben wird empfohlen, bei den blauen Kolonien eine Gruppenbestimmung durchzuführen, da auch andere Streptokokken-Arten (z.B. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus porcinus* und *Streptococcus gallolyticus*) blau gefärbt werden können.

2.4.5 GBS-Medium von medco Diagnostika GmbH

Das GBS-Medium (siehe Abbildung 7) dient zum direkten Nachweis von B-Streptokokken aus dem Vaginal- bzw. Rektalabstrich ohne weitergehende Differenzierung. Diese Serum-Stärke-Bouillon färbt sich bei der Anwesenheit von *Streptococcus agalactiae* orange. Dieser Test wird als positiv gewertet, wenn der Tupfer oder das Medium eine Orangefärbung aufweist. Eine Verfärbung kann laut Hersteller schon nach 4 - 6h Stunden sichtbar werden. Die Sensitivität beträgt 96 - 99%. Somit können auch geringe Keimzahlen zuverlässig detektiert werden. Die Packungsbeilage gibt an, dass nicht-hämolysierende B-Streptokokken keine Pigmente bilden. Die Inkubationstemperatur beträgt 35 - 37°C (aerob). Bei hoher Keimzahl kann frühestens nach 4h ein Farbumschlag zu sehen sein, aber eine Endablesung sollte erst nach 24h unternommen werden.



Abbildung 7: GBS-Medium [URL - 7]

Das Bakterium *Streptococcus agalactiae* bildet in dem GBS-Medium von medco Diagnostika GmbH einen Farbumschlag nach orange.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0,9 % NaCl-Lösung	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (Deutschland)
Streptococcal grouping latex, Strep kit	DiaMondial, Vienna (Österreich)

3.2 Medien

Tabelle 2: Nährmedien

Medien	Hersteller
<i>Brilliance</i> GBS Agar	OXOID GmbH, Wesel (Deutschland)
CHROMagar TM StrepB	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld (Deutschland)
CNA-Agar (Columbia-CNA-Agar + 5 % Schafblut)	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
COS-Agar (Columbia-Agar + 5 % Schafblut)	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
GBS-Medium	medco Diagnostika GmbH, München (Deutschland)
Granada TM Agar	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
Granada TM Bouillon biphasisch	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
Müller-Hinton-Bouillon (LHB-Bouillon mit 3 % lysiertem Pferdeblut)	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
StrepB <i>Select</i> Medium	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette (Frankreich)
TSS-Agar (Trypton-Soja-Agar + 5% Schafblut)	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)

3.3 Bakterienstämme

Tabelle 3: Bakterienstämme

Stamm-ID	ATCC-Nummer	Hersteller
<i>Canida albicans</i>	INT 125	Patientenstamm
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33591	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	Doenitz ProLab, Augsburg (Deutschland)

3.4 Software

Tabelle 4: Software

Software	Hersteller
Compass Software 1.2 SR for flex	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (Deutschland)
HighFlexX 2.0.19.62	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
Hybase 6 Statistik	Tieto GmbH, Eschborn (Deutschland)
LabPro V3.0 MultiRegional	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
MALDI Biotyper 3	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (Deutschland)
Medizinisches Informationssystem	CSMed GmbH, Darmstadt (Deutschland)
PROMED-open	MCS Modulare Computer und Software Systeme AG, Eltville am Rhein (Deutschland)
ValiScan TM Expert-System	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
VITEK 2 Advanced Expert System	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
VITEK 2 Systems Software	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)

3.5 Geräte und Zubehör

Tabelle 5: Geräte und Zubehör

Geräte/Zubehör	Hersteller
Impföse (1µl, 10µl), steril	nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe, Deutschland)
MALDI Biotyper-Microflex LT 60	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (Deutschland)
MicroScan 96 Well Tray Lids	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)

MicroScan Prompt Inoculation System-D	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
MicroScan RENKO-Inokulator	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
MicroScan WalkAway 96 plus	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)
MSP 96 Target polished steel, microScout Target	Bruker Daltonik GmbH, Bremen (Deutschland)
Poly Stainer Färbeautomat	ILU Instruments S. A., Königswinter (Deutschland)
VITEK 2	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
VITEK 2-smart carrier	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
VITEK 2-Resistenzkarte AST-ST01	bioMérieux, Nürtingen (Deutschland)
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach (Deutschland)
WalkAway Panels MICroSTREP <i>plus</i>	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn (Deutschland)

4 Methoden

4.1 Ermittlung der Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze von *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe (bis 10^{-6} Verdünnung) angefertigt. Von einem Übersichtsmedium (COS-Agar) wurde etwas Koloniematerial einer Übernachtskultur von *S. agalactiae* mit einem Spatel entnommen und ein McFarland-Wert (MCF) von 0,5 in 1 ml NaCl-Lösung [0,9 %] eingestellt. Für die Verdünnungsreihe wurden jeweils 900 µl NaCl-Lösung [0,9 %] vorgelegt und 100 µl wurde aus vorheriger Verdünnung zu dieser NaCl-Lösung gegeben. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe auf je einem CNA-, CHROMagarTM StrepB-, GranadaTM-, Brilliance GBS- und StrepB Select-Agar mit einer 10-µl-Impföse ausplattiert. Die beimpften Nährmedien wurden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob (GranadaTM Agar: 7,5 % CO_2 -Brutschrank) inkubiert. Nach 24 h (und 48 h) wurden die Kolonien ausgezählt.

Die GranadaTM Bouillon wurde nach Packungsbeilage vorbereitet. Danach wurde je ein Tupfer in jeder Verdünnungsstufe getränkt und in die Bouillon gesteckt (Tupfer abbrechen). Für das GBS-Medium wurden nur die Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} getestet. Diese wurde bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob (GranadaTM Bouillon: 7,5 % CO_2 -Brutschrank) inkubiert und nach 24h (und 48h) ausgewertet.

Für die Routine ist es notwendig zu wissen, nach wie vielen Stunden B-Streptokokken zuverlässig detektiert werden können. Daher wurde in einem zweiten Versuch der Zeitfaktor der Nährmedien ermittelt:

Dafür wurde der Qualitätskontrollstamm von *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 verwendet. Mit einer 1-µl-Impföse wurde je eine Kolonie der Übernachtskultur von einem COS-Medium entnommen und auf die chromogenen Nährmedien (CHROMagarTM StrepB-, GranadaTM-, Brilliance GBS- und StrepB Select-Agar) ausgestrichen. Anschließend wurden die beimpften Nährmedien bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob (GranadaTM Agar: 7,5 % CO_2 -Brutschrank) inkubiert und nach 6h, 12h, 24h und 48h betrachtet.

Für die Bouillons (GranadaTM und GBS-Medium) wurden je eine Kolonie mit dem Tupfer entnommen und in das Röhrchen gegeben (Tupfer abbrechen). Diese wurden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob (GranadaTM Bouillon: 7,5 % CO₂-Brutschrank) inkubiert und nach (GBS-Medium: 4h) 6h, 12h und 24h abgelesen.

4.2 Testung der chromogenen Nährmedien

4.2.1 Selektivität

Neben den B-Streptokokken können andere Organismen auf den chromogenen Nährmedien wachsen oder gehemmt werden.

Um die Selektivität zu testen, wurden auf den chromogenen Nährmedien (CHROMagarTM StrepB-, GranadaTM-, *Brilliance* GBS- und StrepB *Select*-Agar) verschiedene Qualitätskontrollstämme (siehe Tabelle 6) ausplattiert und für 24h bzw. 48h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob (GranadaTM Agar: 7,5 % CO₂-Brutschrank) inkubiert.

Die Bouillons (GranadaTM und GBS-Medium) wurden nach Packungsbeilage vorbereitet. Anschließend wurde mit einem Tupfer je eine Kolonie der Übernachtskulturen von verschiedenen Organismen (siehe Tabelle 6) entnommen und in die Bouillon gesteckt. Diese wurden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob (GranadaTM Bouillon: 7,5 % CO₂-Brutschrank) inkubiert und nach 24h und 48h abgelesen.

Tabelle 6: Übersicht zu den getesteten Organismen auf den verschiedenen Nährmedien

Mit „+“ gekennzeichneten Bakterienstämme wurden auf den Medien getestet und die mit „-“ gekennzeichneten Stämme nicht.

taxonomische Einteilung	Nährmedien	CHROMagar™ StrepB	Granada™ Agar	<i>Brilliance</i> GBS	StrepB <i>Select</i>	Granada™ Bouillon	GBS - Medium
	ATCC – Stämme						
grampositive Kokken	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	-	-	-	-	+	+
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	+	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 33591	+	+	+	+	+	-
	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	+	+	+	+	+	+
gramnegative Stäbchen	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	-
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	+	+	+	+	+	+
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+	+	+	+	+	-
Hefepilz	<i>C. albicans</i> INT 125	+	+	+	+	+	-

4.2.2 Verwendung von Patientenproben

Für die Auswahl der Proben wurden Abstriche der Mutterschaftsvorsorgeuntersuchung mit der Untersuchungsanforderung auf β -hämolisierende Streptokokken verwendet. Primärmaterial wurde auf den bluthaltigen CNA-Agar (Referenzmethode in dieser Arbeit) und auf die verschiedenen chromogenen Nährmedien (CHROMagarTM StrepB-, GranadaTM-, *Brilliance* GBS- und StrepB *Select*-Agar) gebracht und mit einer sterilen Impfföse 3-fach fraktioniert ausgestrichen. Diese Nährmedien wurden anschließend bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (GranadaTM-Agar: 7,5 % CO₂-Brutschrank) für 24 h inkubiert.

Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Nährmedien erstmals abgelesen, um festzustellen, ob das Bakterium *Streptococcus agalactiae* gewachsen ist oder nicht.

Bei einem Wachstum von Bakterien wurde eine Identifizierung mittels MALDI TOF MS (siehe 4.3) durchgeführt. Ergab sich eine eindeutige Identifizierung von *Streptococcus agalactiae*, wurden die dazugehörigen Antibiotogramme mithilfe des VITEK 2- Systems (siehe 4.4.1) und dem WalkAway-System (siehe 4.4.2) erstellt.

Die Nährmedien wurden für weitere 24h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (GranadaTM-Agar: 7,5 % CO₂-Brutschrank) inkubiert und danach erneut abgelesen.

Die GranadaTM Bouillon und das GBS-Medium wurden gezielt mit positiven und negativen Proben untersucht. Dabei wurden diese laut Packungsbeilage vorbereitet und beimpft. Nach 24h (und 48h) Inkubation bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (GranadaTM-Bouillon: 7,5 % CO₂-Brutschrank) wurden sie hinsichtlich eines Farbumschlages betrachtet.

4.3 Keimidentifizierung

Die Keimidentifizierung wurde mit der Kombination aus Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometer mit Flugzeitanalysator (MALDI TOF MS) durchgeführt.

Bei dem MALDI TOF MS (siehe Abbildung 8) wurde eine einzelne Kolonie aus einer Übernachtskultur mit einem Holzstäbchen auf das Target geschmiert und kurz angetrocknet. Anschließend wurde 1 μl Matrix auf die Kolonie pipettiert. Danach wurde

das Target in den MALDI Biotyper-Microflex LT 60 eingelegt und analysiert. Das entstandene Massenspektrum wurde mit der Bruker-Keimdatenbank verglichen. Das Ergebnis mit dem besten Score ($> 2,4$) wird als der zu identifizierende Keim angenommen.

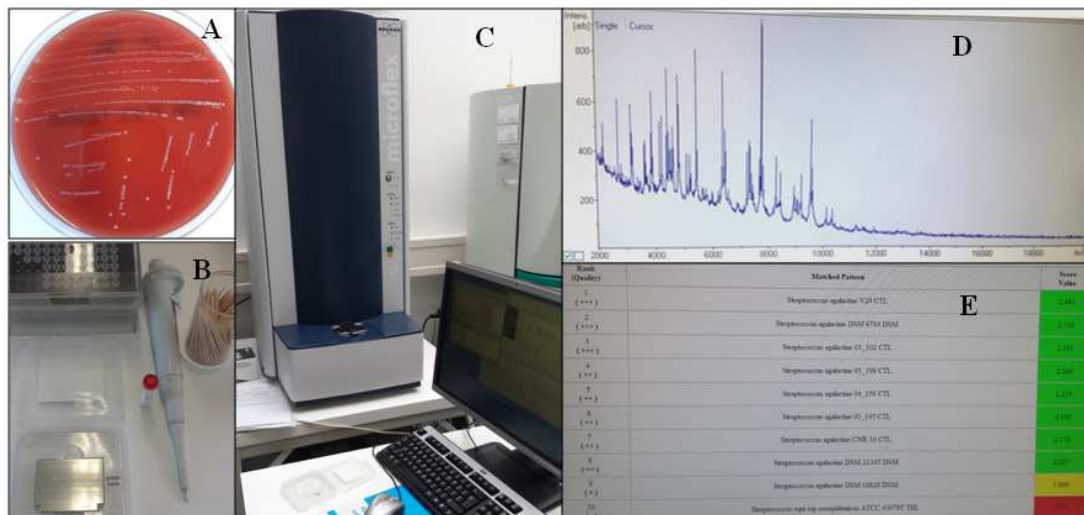


Abbildung 8: Keimidentifizierung mittels MALDI TOF MS

A zeigt ein bewachsenes CNA-Nährmedium nach 24 h Inkubation und **B** das Beimpfen des Targets mit sterilem Holzstäbchen und Matrix. **C** stellt den MALDI TOF MS dar. **D** repräsentiert das ermittelte Spektrogramm und **E** die Scoreübersicht der Ergebnisse.

Für eine Plausibilitätsprüfung der Identifizierung von *Streptococcus agalactiae* mittels MALDI TOF wurde das Strep Kit von DiaMondial verwendet, welches die unterschiedlichen Gruppen A, B, C, D, F und G der Lancefield-Einteilung der Streptokokken nachweist. Die Analyse der B-Streptokokken wurde nach der Anleitung des Kits durchgeführt.

4.4 Resistenztestung

4.4.1 VITEK 2-System

Mittels VITEK 2-System (siehe Abbildung 9) wurden MHK-basierte Antibiotogramme erstellt. Die zu untersuchende Probe wurde in 2,5 ml steriler NaCl-Lösung [0,9%] resuspendiert und ein MCF von 0,5 eingestellt. Für die Resistenztestung von

Streptokokken der Gruppe B wurde die Resistenzkarte AST-ST01 verwendet (siehe Tabelle 7).

Während der Inkubationszeit von ca. 18 h wurde automatisch das Wachstum in den einzelnen Kammern der Resistenzkarte mit dem VITEK 2-System gemessen. Daraus wurden die Minimale-Hemmkonzentrations-Werte (MHK-Werte) gebildet und das System interpretierte diese (s = sensibel, r = resistent, i = intermediär) nach EUCAST [EUCAST, 2014]. Anschließend wurden die Ergebnisse durch das Expert-System des VITEK 2-Systems geprüft und für den Nutzer zur Verfügung gestellt.

Tabelle 7: Antibiotika der VITEK 2-Resistenzkarte AST-ST01

Abgebildet sind die gemessenen Konzentrationen für jedes Antibiotikum und der dazugehörige MHK-Bereich, in dem die über die geometrische Reihe ermittelten MHK-Ergebnisse liegen.

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]	MHK-Bereich [µg/ml]	
		≤	≥
Ampicillin (AM)	0,5; 1; 4; 8	0,25	16
Benzylpenicillin (P)	0,06; 0,12; 0,5; 2	0,06	8
Cefotaxime (CTX)	0,25; 0,5; 1; 2	0,12	8
Ceftriaxone (CRO)	0,12; 0,25; 1; 4	0,12	8
Clindamycin (CM)	CM 0,12; CM 0,25; CM 0,5; CM/E 0,5/0,1	0,25	1
Erythromycin (E)	1; 2; 4; 16	0,12	8
Induzierte Clindamycin Resistenz (ICR)	CM 0,5; CM/E 0,25/0,5	- NEG	+ POS
Levofloxacin (LEV)	1; 2; 4; 16	0,25	16
Linezolid (LNZ)	2; 4	2	8
Tetracycline (TE)	0,12; 0,5; 1; 4	0,25	16
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)	8/152; 16/304; 64/1216	10(0,5/9,5)	320(16/304)
Vancomycin (VA)	0,5; 1; 2; 4	0,12	8



Abbildung 9: VITEK 2-System

A zeigt die Carrier Station und **B** das VITEK 2-Gerät. **C** ist eine AST-ST01 Resistenzkarte und **D** ist die Resistenzkarte nach der Inkubation. Anhand der Trübung ist zu sehen, dass das Wachstum in verschiedenen Kammern stattgefunden hat.

4.4.2 WalkAway-System

Das WalkAway-System erstellt wie das VITEK 2-System MHK-basierende Anitibiogramme. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit war diese Methode für *S. agalactiae* im Diagnosticum nicht etabliert. Deshalb wurde gemäß der Qualitätsrichtlinien (RiliBÄK, EUCAST) die Methode 20 Tage in Folge mit den Stämmen *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) und *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) validiert (siehe Anlage Tabelle 14). [EUCAST (2014); RiliBÄK (2013)]

Es wurde mit einem sterilen Spatel etwas Koloniematerial einer Übernachtskultur von einem bewachsenen Nährmedium in 3 ml Inokulumsalzlösung resuspendiert. Dabei wurde ein MCF von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden 100 µl der Suspension in die LHB-Bouillon (Müller-Hinton-Bouillon mit 3% lysiertem Pferdeblut) pipettiert und das Gefäß gut verschlossen. Durch mehrmaliges Wenden, wurde die Suspension gut vermischt. Zusätzlich wurde eine Reinheitskontrolle auf dem COS-Medium erstellt (Inkubation bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24h). Danach wird die Bakteriensuspension in eine Impfwanne überführt und mit dem RENKO-Inokulator in das MICroSTREP *plus* Panel pipettiert. Anschließend wurde das beimpfte Panel mit einer Abdeckplatte in den WalkAway-96 plus (siehe Abbildung 10) gestellt.

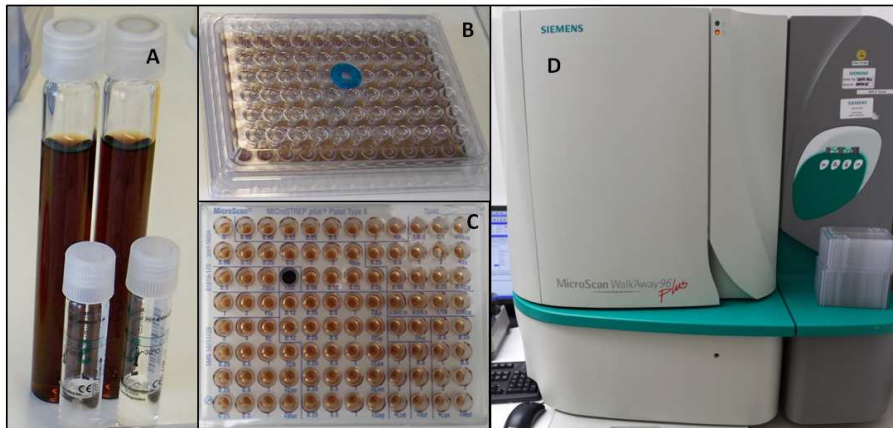


Abbildung 10: WalkAway-System

A zeigt die LHB-Bouillon und die Inokulumsalzlösung. Eine Impfwanne mit der Bakteriensuspension ist bei **B** zu sehen und **C** zeigt das beimpfte MICroSTREP *plus* Panel. Das WalkAway-Gerät ist unter **D** abgebildet.

Das Panel besteht aus unterschiedlichen Kammern. In diesen Kammern befinden sich verschiedene Konzentrationen von unterschiedlich eingesetzten Antibiotika. Nach der Inkubation von 20-24 h bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ stellt das System anhand der Trübung fest, ob eine Hemmung bezüglich des Wachstums auftritt oder nicht. Daraus werden die MHK-Werte gebildet. Die MHK-Werte werden nach dem System interpretiert (s = sensibel, r = resistent, i = intermediär) und stehen danach dem Nutzer zur Verfügung (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Antibiotika des Panels MICroSTREP *plus*

Abgebildet sind die gemessenen Konzentrationen für jedes relevante Antibiotikum und der dazugehörige MHK-Bereich, in dem die über die geometrische Reihe ermittelten MHK-Ergebnisse liegen (S = sensibel; I = intermediär; R = resistent).

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]	MHK-Bereich [µg/ml]		
		S	I	R
Azithromycin (Azi)	0,25 – 2	≤ 0,25	0,5	> 0,5
Chloramphenicol (C)	1 – 16	≤ 8	-	> 8
Clindamycin (Cd)	0,06 – 0,5	≤ 0,5	-	> 0,5
Erythromycin (E)	0,06 – 0,5	≤ 0,25	0,5	> 0,5
Levofloxacin (Lvx)	0,25 – 4	≤ 1	2	> 2
Penicillin (P)	0,03 – 4	≤ 0,25	-	> 0,25
Tetracycline (Te)	0,5 – 4	≤ 1	2	> 2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (T/S)	0,25/4,75 – 2/38	≤ 1/19	2/38	> 2/38
Vancomycin (Va)	0,12 – 1	≤ 2	-	> 2

5 Ergebnisse

5.1 Resistenzstatistik 2013 und 2014

Mit Hilfe der Software Hybase 6 Statistik der Tieto Deutschland GmbH wurden alle eingesandten Proben des Diagnosticums zur Mutterschaftsvorsorgeuntersuchungen im Zeitraum vom 01.01.2014 bis 30.06.2014 herausgefiltert und in einer Übersicht dargestellt (siehe Abbildung 11). Dies dient als Überblick über die aktuelle Resistenzlage des Keimes *S. agalactiae* und gegebenenfalls lassen sich epidemiologische Zusammenhänge erkennen.

Die Abbildung 11 bietet eine Übersicht der getesteten Antibiotika für β -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B. Insgesamt wurden 290 Proben auf die dargestellten (Abbildung 11) Antibiotika getestet. Die Statistik zeigt, dass fast alle getesteten Antibiotika gegenüber *Streptococcus agalactiae* wirksam sind. Jedoch ist *S. agalactiae* nur zu 14,2 % sensibel gegenüber Tetracyclin. Tetracyclin wird jedoch nicht während der Schwangerschaft eingesetzt. [Stille *et al.*, 2013].

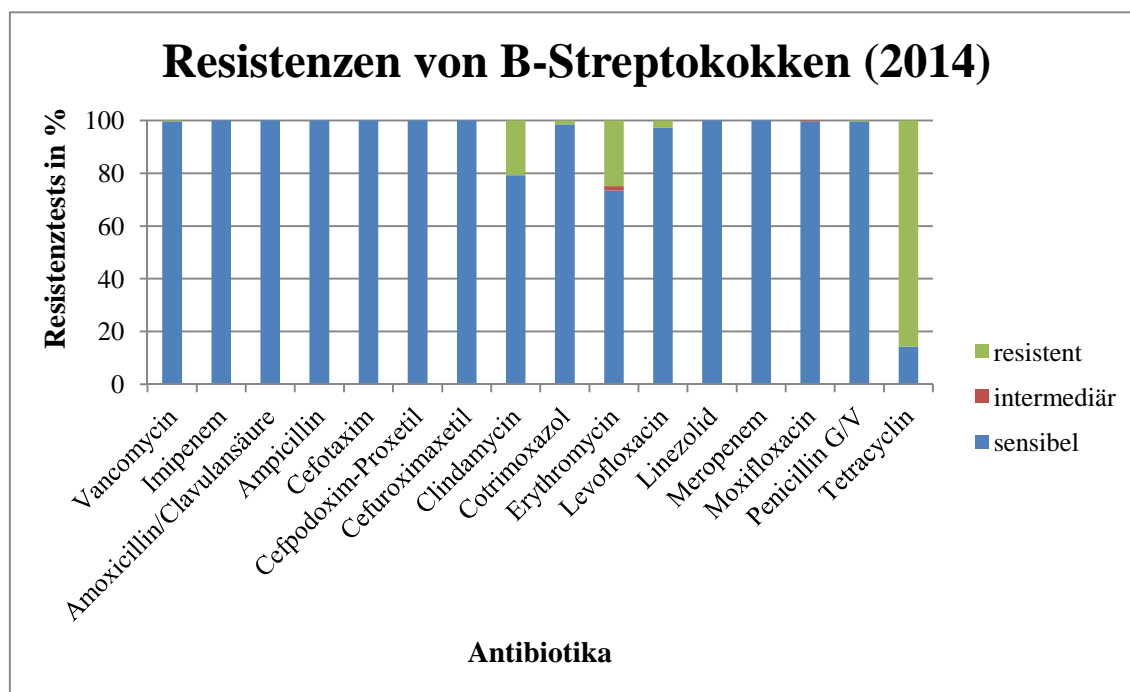


Abbildung 11: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) der B-Streptokokken (n = 290) für den Zeitraum vom 01.01.2014 bis 30.06.2014

Die am häufigsten zur Therapie eingesetzten Antibiotika sind Penicillin, Clindamycin und Erythromycin [Stille *et al.*, 2013; URL - 2]. Eine Resistenz gegenüber Erythromycin weisen 24,83 % (72 von 290 Proben) der getesteten *Streptococcus agalactiae* Stämme auf und in 20,7 % (60 von 290 Proben) der Fälle eine Resistenz gegenüber Clindamycin. Von diesen 290 Testungen besaßen 10 *Streptococcus agalactiae* Stämme eine induzierte Clindamycin Resistenz. *S. agalactiae* war zu 99,6 % sensibel gegenüber Penicillin (siehe Abbildung 11). Ein *S. agalactiae* Stamm einer Patientenprobe (von 290 Proben) lieferte eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Penicillin, die zur Überprüfung an das Nationale Referenzzentrum versandt wird.

Die Abbildung 12 stellt eine Resistenzstatistik der Software Hybase 6 Statistik der Tieto Deutschland GmbH gemäß CLSI von β -hämolisierenden Streptokokken im Jahr 2013 für die eingesandten Proben des Diagnosticums dar [CLSI, 2012]. Dabei wurden insgesamt 553 *S. agalactiae* Patientenstämme auf ihre Resistenzen getestet.

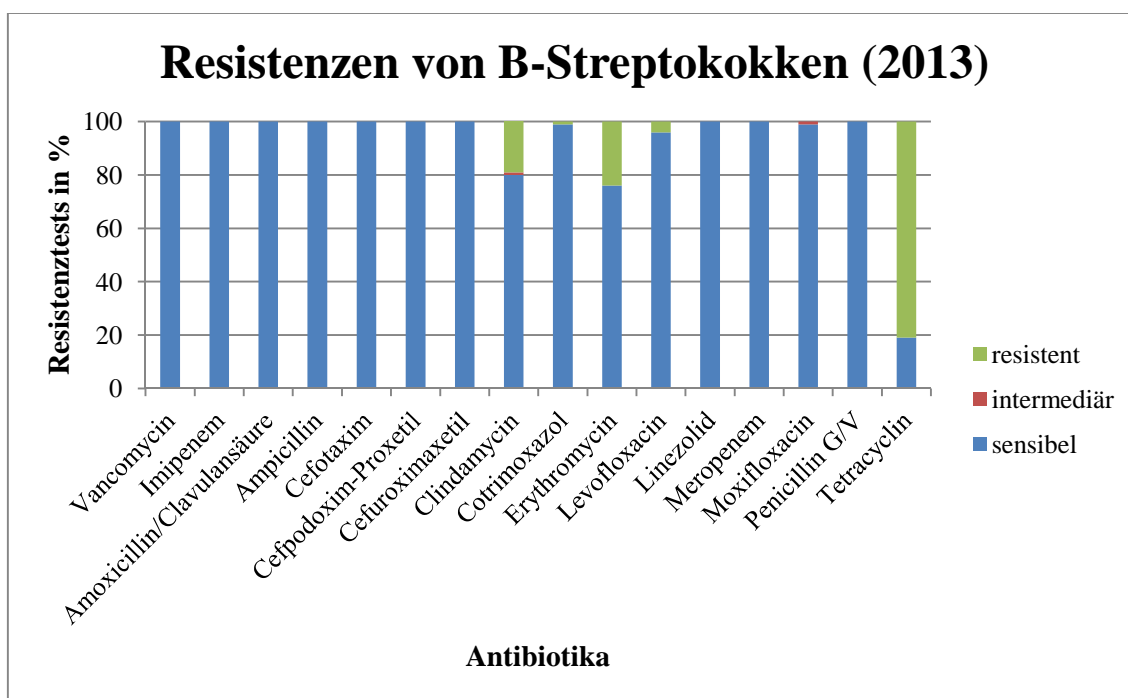


Abbildung 12: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach CLSI) der B-Streptokokken (n = 553) für den Zeitraum vom 01.01.2013 bis 31.12.2013

Die Statistik zeigt, dass fast alle getesteten Antibiotika gegenüber *Streptococcus agalactiae* wirksam sind. Eine Ausnahme bildet Tetracyclin. *S. agalactiae* ist nur zu 19 % sensibel gegenüber Tetracyclin. Von den gesamten Patientenproben (553) weisen 133 der getesteten *Streptococcus agalactiae* Stämme eine Erythromycinresistenz (24%) auf. Clindamycin zeigt eine Resistenz gegenüber *S. agalactiae* von 20 % (111 von 553 Testungen). *S. agalactiae* war zu 100 % sensibel gegenüber Penicillin.

5.2 Ermittlung der Nachweisgrenze

Alle Medien bildeten die Kolonien laut Herstellerangabe aus, bis auf den GranadaTM Agar (siehe Abbildung 13). Dieser bildete weiße Kolonien, statt die zu erwartenden orange-roten Kolonien. Die MALDI TOF MS Analyse zeigte eine eindeutige Identifizierung von *Streptococcus agalactiae*.

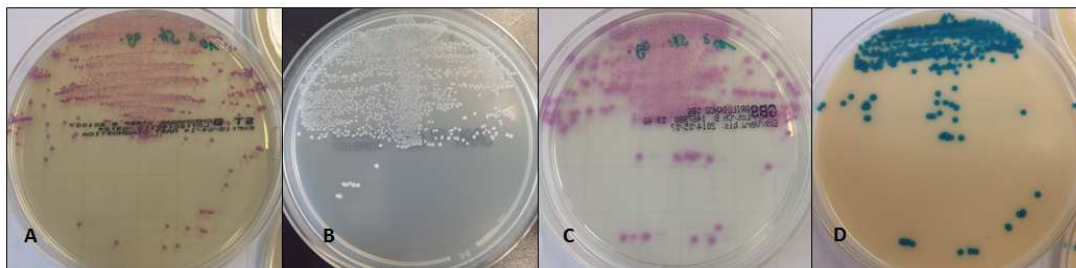


Abbildung 13: *Streptococcus agalactiae* nach 24h Inkubation

Diese Abbildung zeigt die vier getesteten chromogenen Nährmedien. A zeigte den CHROMagarTM StrepB, B den GranadaTM Agar, C den Brilliance GBS Agar und D den StrepB Select Agar.

Mit Hilfe der Verdünnungsreihe konnte die Nachweisgrenze der einzelnen chromogenen Nährmedien ermittelt werden. Die Tabelle 9 zeigt die Übersicht zu den Verdünnungsstufen der vier festen Nährmedien und den zwei Bouillons. Als Referenz diente der CNA-Agar.

Bei drei Nährmedien (CHROMagarTM StrepB, Brilliance GBS Agar und GranadaTM Agar) konnten B-Streptokokken bis zu der Verdünnungsstufe 10^{-6} nachgewiesen werden. Während es auf dem StrepB Select Agar noch bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} zu einem Wachstum von *Streptococcus agalactiae* kam. Der CNA-Agar konnte ebenso bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} zuverlässig B-Streptokokken detektieren.

Sowohl die GranadaTM Bouillon als auch das GBS-Medium zeigten in keinem Fall einen Farbumschlag, weder nach 24 noch nach 48h Inkubation. Der Versuchsansatz wurde wie folgt variiert:

- Zum einen wurde ein MCF von 0,5 einer Übernachtskultur (*Streptococcus agalactiae* ATCC 13813) in 1 ml NaCl-Lösung [0,9 %] eingestellt. Die Bouillon wurde direkt mit einem Wattetupfer bzw. 100 µl der Suspension beimpft.
- Zum anderen wurde Koloniematerial (1 KBE) einer Übernachtskultur (*Streptococcus agalactiae* ATCC 13813) mit einem Wattetupfer direkt in die Bouillon gesteckt bzw. mit einem Spatel resuspendiert.

In allen vier Fällen kam es weder nach 24h noch nach 48h zu einem Farbumschlag. Nach 24h wurde aus den Bouillons mit einer 10-µl-Impföse die Suspension auf je einem COS-Agar ausplattiert und für 24h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. In jedem Fall konnte auf dem COS-Agar *Streptococcus agalactiae* nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Ermittlung der Nachweisgrenze der getesteten Nährmedien

Bei den festen Nährmedien wurden die KBE der einzelnen Verdünnungsstufen des Keimes *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) gezählt. Die Bouillons wurden hinsichtlich des Farbumschlages beurteilt. Die Verdünnungsstufen wurden auf den folgenden chromogenen Nährmedien ausplattiert: CHROMagar™ StrepB-, Granada™-, Brilliance GBS- und StrepB Select-Agar. Als Reverenz dient der CNA-Agar (grau unterlegt). Folgende Bouillons wurden getestet: Granada™ Bouillon und GBS-Medium.

Nährmedium	Fest					Flüssig	
Bezeichnung	CHROMagar™ StrepB	Granada™	Brilliance GBS	StrepB Select	CNA – Agar	Granada™ Bouillon	GBS-Medium
Verdünnungsstufe	[KBE]					Farbumschlag / kein Farbumschlag	
10 ⁻³	Rasen	Rasen	Rasen	Rasen	Rasen	kein Farbumschlag	kein Farbumschlag
10 ⁻⁴	183	177	156	195	184	kein Farbumschlag	kein Farbumschlag
10 ⁻⁵	46	65	18	27	85	kein Farbumschlag	kein Farbumschlag
10 ⁻⁶	2	6	1	1	11	kein Farbumschlag	kein Farbumschlag
10 ⁻⁷	0	0	0	1	1	kein Farbumschlag	kein Farbumschlag
erwartete Färbung	malvenfarbig	orange-rot	pink	blau	-	orange-rot	orange-rot
festgestellte Färbung	malvenfarbig	weiß	pink	blau	-	-	-

Bei der Ermittlung des Zeitfaktors der chromogenen Nährmedien kam es nach 6h zu einem schwachen Wachstum an den Stellen mit der größten Keimzahl. Nach 12h konnten deutlicher Kolonien detektiert werden und nach 24h Inkubation haben sich große farbige Kolonien gebildet. Nach 48h wuchsen die Kolonien weiter an und die Farbe wurde etwas dunkler.

Bei der GranadaTM Bouillon und dem GBS-Medium kam es zu keinem Farbumschlag.

5.3 Testung der chromogenen Nährmedien

Um zu ermitteln, ob und gegebenenfalls in welcher Farbe verschiedene Mikroorganismen auf den Nährmedien detektiert werden können, wurden verschiedene Qualitätskontrollstämme auf den chromogenen Nährmedien ausgestrichen bzw. in die Bouillon überführt und laut Herstellerangaben inkubiert. Das Ergebnis der Testung auf die Selektivität ist in der Tabelle 10 zu sehen.

Auf dem *Brilliance* GBS Agar kam es zu keinem Wachstum der getesteten Mikroorganismen.

In der GranadaTM Bouillon und dem GBS-Medium kam es bei den getesteten Mikroorganismen zu keinem Farbumschlag.

Auf dem GranadaTM Agar kam es zu einem Wachstum von allen getesteten Mikroorganismen. Auf dem CHROMagarTM StrepB und StrepB *Select* Agar sind jeweils *Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* gewachsen. Das Bakterium *Klebsiella pneumoniae* lässt sich gut von den B-Streptokokken unterscheiden, da es in einer anderen Farbe wächst. Auf dem CHROMagarTM StrepB Agar kam es zur Ausbildung blauer Kolonien und auf dem StrepB *Select* Agar zu violetten Kolonien. Das Bakterium *Streptococcus pyogenes* wächst auf beiden Nährmedien in derselben Farbe wie *Streptococcus agalactiae*.

Tabelle 10: Selektivität der Nährmedien

Testung von verschiedenen Qualitätskontrollstämmen auf den chromogenen Nährmedien: CHROMagar™ StrepB-, Granada™-, Brilliance GBS- und StrepB Select-Agar. Folgenden Bouillons wurden getestet: Granada™ Bouillon und GBS-Medium. Grau unterlegt stellt den positiven Testkeim dar.

Medium	Fest				Flüssig	
Hersteller	CHROMagar™ StrepB	Granada™ Agar	Brilliance GBS	StrepB Select	Granada™ Bouillon	GBS-Medium
ATCC-Stämme	positiv (+) / negativ (-)					
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	+ (weiß)	-	-	-	nicht getestet
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	+ (weiß)	-	-	-	nicht getestet
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	-	+ (weiß)	-	-	-	nicht getestet
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	+ (malvenfarbig)	+ (weiß)	-	+ (blau)	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	+ (weiß)	-	-	-	nicht getestet
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	+ (weiß)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+ (blau, schwach)	+ (weiß)	-	+ (violett)	-	nicht getestet
<i>C. albicans</i> INT 125	-	+ (weiß)	-	-	-	nicht getestet
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	malvenfarbig	weiß	pink	blau	orange-rot	orange-rot

Tabelle 11: Übersicht der Patientenproben

Diese Tabelle zeigt die Anzahl der insgesamt getesteten Proben zu jedem Nährmedium. Es wird unterschieden in positive (Wachstum von *S. agalactiae*) und negative (kein Wachstum von *S. agalactiae*) Proben. Auch hier dient der CNA-Agar (grau unterlegt) als Referenzmethode.

Nährmedium	Anzahl der getesteten Proben	Anzahl der negativen Proben	Anzahl der positiven Proben	richtig positiv	richtig negativ	falsch positiv	falsch negativ
CHROM-agar TM	68	61	7	7	60	0	1
Granada TM Agar	47	46	1	1	46	0	0
<i>Brilliance</i> GBS	29	14	15	15	14	0	0
<i>StrepB Select</i>	33	18	15	15	15	0	3
Granada TM Bouillon	3	1	2	2	0	0	1
GBS-Medium	5	2	3	3	1	0	1
CNA – Agar	316	288	28				

Im Zweiten Schritt wurde die Qualität der chromogenen Nährmedien anhand von Patientenproben im Vergleich zur Referenzmethode (CNA-Agar) untersucht. (Tabelle 11).

Die Tabelle 11 stellt alle getesteten Patientenproben dar. Insgesamt wurden 316 Patientenproben hinsichtlich der Mutterschaftsvorsorgeuntersuchung getestet. 28 Proben wurden als positiv detektiert. Auf dem CHROMagarTM wurden 68 Proben getestet. Davon waren acht positiv, jedoch erkannte dieser eine Probe nicht als positiv. 47 Proben wurden auf dem GranadaTM Agar getestet. Eine Probe konnte als positiv detektiert werden. Auf dem *Brilliance* GBS Agar wurden 29 Proben untersucht. Als positiv konnten 15 Proben interpretiert werden. Auf dem StrepB *Select*-Agar wurden 33 Proben getestet. Dieses Nährmedium konnte 15 Proben zuverlässig als positiv detektieren. Jedoch erkannte es drei Proben nicht als positiv.

Eine eindeutige Identifizierung von B-Streptokokken konnte auf jedem chromogenen Nährmedium, anhand der Beurteilung der Farbe, getroffen werden. Die Bestätigung wurde mit dem MALDI TOF MS bzw. dem Strep Kit (DiaMondial) vorgenommen.

Die GranadaTM Bouillon wurde mit drei positiven Proben getestet. Davon zeigten zwei Proben nach 48 h Inkubation einen rot-orangen Farbumschlag. Die andere Probe wies keinen Farbumschlag auf.

Das GBS-Medium wurde mit fünf Primärmaterialien getestet. Eine negative Probe und vier positive Proben. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit kam es bei drei positiven Proben zu einem orange-roten Farbumschlag. Zwei Proben haben keinen Farbumschlag gezeigt, davon war die eine negativ und die andere positiv. Nach 48 h Inkubation gab es keine Veränderung.

Tabelle 12: Nachweis und Resistenztestung positiver Patientenproben

Dargestellt sind die positiven Patientenproben innerhalb von 12 Wochen (n = 28), hinsichtlich der Nachweismethode und MHK-basierte Resistenztestung von Clindamycin, Erythromycin, Penicillin und induzierte Clindamycinresistenz. Insgesamt wurden 316 Patientenproben auf β -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B getestet. Die induzierte Clindamycinresistenz wird nur als positiv (POS) oder negativ (NEG) bei dem VITEK 2-System angegeben. Rot markiert sind falsch negativ detektierten Proben.

Nr.	Nähr- medium	erwartete Kolonie- farbe	erhaltene Kolonie- farbe	Wachstum anderer Mikro- organismen	Antibiotika	WalkAway		VITEK		richtig (+) falsch (-)
						MHK [µg/ml]	sensibel (S) / resistent (R)	MHK [µg/ml]	sensibel (S) / resistent (R)	
1	CHROM- agar TM	malven- farbig	malven- farbig		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
					Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
2	CHROM- agar TM	malven- farbig	malven- farbig	<i>E. faecalis</i> (blau)	Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
					Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
3	CHROM- agar TM	malven- farbig	kein Wachstum							-
4	CHROM- agar TM	malven- farbig	malven- farbig	<i>E. faecalis</i> (blau)	Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
					Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte			NEG	-	+

					Clindamycin-resistenz					
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
5	CHROM-agar TM	malven-farbig	malven-farbig		Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
					Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin-resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
6	CHROM-agar TM	malven-farbig	malven-farbig	<i>E. faecalis</i> (blau)	Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
					Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin-resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
7	CHROM-agar TM	malven-farbig	malven-farbig	<i>E. faecalis</i> (blau)	Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	R*	+
					Erythromycin	$> 0,5$	R	2	R	+
					induzierte Clindamycin-resistenz			POS	+	
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
8	CHROM-agar TM	malven-farbig	malven-farbig	<i>E. faecalis</i> (blau)	Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
					Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin-resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+

9	Granada ^T M Agar	rot-orange	orange		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	Brilliance GBS	pink	pink		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
10	StrepB Select	blau	blau	Strep. anginosus (rosa)	Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
					Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
11	Brilliance GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
					Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
12	StrepB Select	blau	kein Wachstum							-
13	StrepB Select	blau	kein Wachstum							-
14	StrepB Select	blau	blau		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
					Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+

					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
15	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
					Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
16	Brilliance GBS	pink	pink		Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
17	Brilliance GBS	pink	pink		Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+
18	Brilliance GBS	pink	pink		Clindamycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,25$	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	$\leq 0,06$	S	$\leq 0,12$	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	$\leq 0,06$	S	+

19	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	<i>StrepB</i> <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
20	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	R*	+
	<i>StrepB</i> <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	> 0,5	R	2	R	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			POS	+	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
21	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	<i>StrepB</i> <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
22	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	<i>StrepB</i> <i>Select</i>	blau	kein Wachstum		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	-
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
23	<i>Brilliance</i>	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+

	GBS									
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau	<i>E. faecalis</i> (violett)	Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
24	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
25	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink	<i>E. faecalis</i> (blau)	Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau	<i>E. faecalis</i> (violett)	Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
26	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
27	<i>Brilliance</i> GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+

	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+
28	Brilliance GBS	pink	pink		Clindamycin	≤ 0,06	S	≤ 0,25	S	+
	StrepB <i>Select</i>	blau	blau		Erythromycin	≤ 0,06	S	≤ 0,12	S	+
					induzierte Clindamycin- resistenz			NEG	-	+
					Penicillin	0,06	S	≤ 0,06	S	+

Tabelle 12 stellt den Nachweis und die Resistenztestung der positiven Patientenproben dar. Eine Probe von dem CHROMagar™ und drei Proben von dem StrepB Select Agar wurden nicht als positiv detektiert.

Auf den negativen Proben kam es teilweise zu einem Wachstum verschiedener Mikroorganismen:

- CHROMagar™ Agar: *Enterococcus faecalis* (blau), *Streptococcus dysgalactiae* (rosa), *Staphylococcus epidermidis* (violett), *Streptococcus anginosus* (rosa), *Staphylococcus haemolyticus* (weiß), *Staphylococcus hominis* (weiß), Lactobacillen (violett)
- Granada™ Agar: *Enterococcus faecalis* (weiß), *Streptococcus gallolyticus* (gelb), *Staphylococcus epidermidis* (weiß/gelb), *Staphylococcus haemolyticus* (weiß), *Staphylococcus hominis* (weiß), *Staphylococcus simulans* (weiß), *Streptococcus salivarius* (weiß), *Candida albicans* (weiß), *Serratia marcescens* (gelb)
- Brilliance GBS Agar: *Enterococcus faecalis* (blau) *Streptococcus salivarius* (rosa/violett), Lactobacillen (blau)
- StrepB Select Agar: *Enterococcus faecalis* (violett), *Streptococcus anginosus* (rosa), *Streptococcus gallolyticus* (blau), Lactobacillen (rosa)

Bei dem CHROMagar™ wuchsen andere Streptokokken-Arten nahezu in derselben Farbe wie der Keim *Streptococcus agalactiae*. Auf dem Granada™ Agar konnten bei den Patientenproben andere Mikroorganismen von den B-Streptokokken unterschieden werden, da die Farbgebung unterschiedlich war. *Streptococcus salivarius* war der einzige Keim, welcher in einer ähnlichen Farbe wie *Streptococcus agalactiae* auf dem Brilliance GBS Agar wuchs. Der Keim *Streptococcus gallolyticus* wuchs in etwa derselben Farbe wie *S. agalactiae* auf dem StrepB Select Agar.

Die Ermittlung der Antibiotogramme mit dem VITEK 2-System und dem WalkAway-System ergab, dass beide Systeme für die Antibiotika dieselben Ergebnisse lieferten (siehe Tabelle 12). Nur die induzierte Clindamycinresistenz konnte mit dem WalkAway-System nicht festgestellt werden. Zwei Patientenproben (Probennummer 7 und 20) besaßen eine induzierte Clindamycinresistenz.

6 Diskussion

6.1 Vergleich der Resistenzstatistik von 2013 mit 2014

Die Abbildung 14 zeigt einen Vergleich der Resistenzstatistik für B-Streptokokken zwischen 2014 und 2013. Es wurden die Antibiotika Clindamycin, Erythromycin und Penicillin hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber *Streptococcus agalactiae* untersucht. Die Statistik wurde zum einen für das Jahr 2013 (Zeitraum: 01.01.2013 - 31.12.2013) und zum anderen für das Jahr 2014 (Zeitraum: 01.01.2014 - 30.06.2014) erstellt. Im Jahr 2013 wurden 553 Patientenproben untersucht und im 1. Halbjahr 2014 waren es 290 Patientenproben.

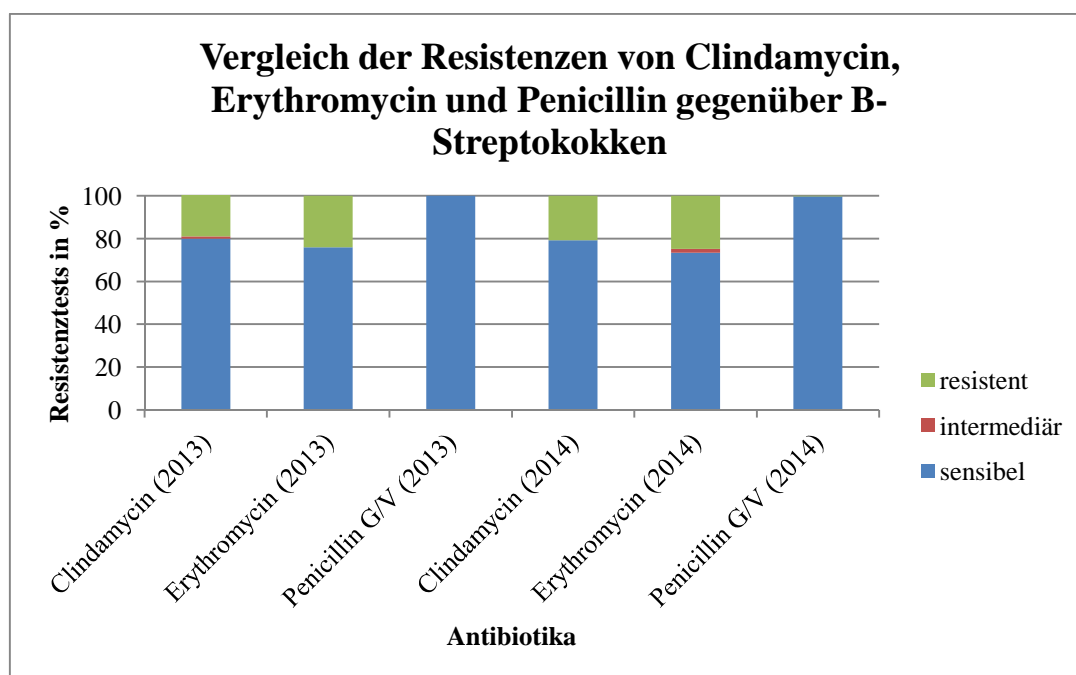


Abbildung 14: Resistenzstatistik von B-Streptokokken von Clindamycin, Erythromycin und Penicillin

Dargestellt ist der Vergleich zwischen den Antibiotika Clindamycin, Erythromycin und Penicillin für den Zeitraum 01.01.2013 bis 31.12.2013 (n=553; MHK-Interpretation nach CLSI) und dem Zeitraum von 01.01.2014 bis 30.06.2014 (n=290; MHK-Interpretation nach EUCAST).

Die Resistenzstatistiken von 2013 mit 2014 unterscheiden sich kaum. 2014 wurde bislang ein *S. agalactiae* Stamm mit einer verminderten Penicillinempfindlichkeit detektiert. Dieser Stamm bedarf einer Abklärung durch das zuständige Nationale

Referenzzentrum. Dadurch kam es zu einem minimalen Resistenzanstieg für Penicillin von 0 % (im Jahr 2013) auf 0,34 % (im Jahr 2014). *S. agalactiae* weist einen Resistenzanstieg von 20 % (im Jahr 2013) auf 20,76 % (im Jahr 2014) für Clindamycin auf. Ein ähnlicher Anstieg der Resistenz konnte auch bei dem Antibiotikum Erythromycin nachgewiesen werden. Hier kam es zu einem Anstieg von 24 % (im Jahr 2013) auf 24,8 % (im Jahr 2014).

Ein Resistenzanstieg lässt sich bei dem Antibiotikum Tetracyclin feststellen von 81 % auf 85,8 % (siehe Abbildung 11 und 12). Dies ist unter anderem auf die Umstellung von CLSI auf EUCAST im Jahr 2013 zurückzuführen. Die CLSI Norm definiert Tetracyclin bis zu einem MHK-Wert von ≤ 2 als sensibel. Die EUCAST Norm legt einen MHK-Wert von ≤ 1 als sensibel fest. [CLSI (2012); EUCAST (2014)]

6.2 Auswertung der chromogenen Nährmedien

6.2.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (siehe Tabelle 9) aller vier chromogenen Nährmedien konnte gut bestimmt werden. Dabei wurde festgestellt, dass drei Nährmedien (CHROMagarTM StrepB, GranadaTM Agar und *Brilliance* GBS Agar) in etwa dieselbe Nachweisgrenze (10^{-6} Verdünnung) besitzen. Ein Nährmedium (StrepB *Select* Agar) konnte eine höhere Nachweisgrenze (10^{-7} Verdünnung) erreichen. Diese entspricht der Nachweisgrenze (10^{-7} Verdünnung) der Referenzmethode (CNA-Agar).

Die Nachweisgrenze des StrepB *Select* Agars stimmt am besten mit der des CNA Agars überein. Auf beiden Nährmedien konnte bei der 10^{-7} Verdünnung 1 KBE gezählt werden. Somit lieferte dieses Medium die beste Nachweisgrenze der vier getesteten chromogenen Nachweismedien. Dennoch ist erkennbar, dass auf dem CNA Agar mehr Kolonien wachsen als bei den anderen Medien. Um diese Aussage über die Nachweisgrenze der Nährmedien bestätigen zu können, müsste der Stichprobenumfang erhöht werden.

Bei der Ermittlung des Zeitfaktors waren alle chromogenen Nährmedien gleich gut. In allen Fällen konnten nach 12h B-Streptokokken zuverlässig detektiert werden. Um bei

einer Mischkultur eindeutig den Keim *Streptococcus agalactiae* nachzuweisen, sollten die angegebene 24h Inkubation abgewartet werden. Denn nach den 24h haben sich gut sichtbare farblich unterscheidbare Kolonien gebildet.

Keine der getesteten Bouillons lieferte bei der Verdünnungsreihe einen Farbumschlag nach 24h bzw. 48h. Obwohl es zu einem Wachstum von *Streptococcus agalactiae* nach dem Ausplattieren auf dem COS-Medium kam. Zufriedenstellend ist die getestete Selektivität der Qualitätskontrollstämmen in der Bouillon. Dort kam es zu keinem Farbumschlag nach 24h bzw. 48h.

Die B-Streptokokken sind auf dem Granada™ Agar weiß gewachsen und bei der Bouillon kam es zu keinem Farbumschlag. Laut Hersteller sollten sich orangefarbene Kolonien bilden bzw. einen rot-orangen Farbumschlag verursachen. Die Qualitätskontrolle sollte laut Packungsbeilage mit dem Qualitätskontrollstamm *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 durchgeführt werden. Für diese Arbeit wurde jedoch der Stamm ATCC 13813 verwendet. Es kann sein, dass der verwendete Qualitätskontrollstamm nicht in der Lage ist, orange-rote Kolonien auszubilden bzw. einen rot-orangen Farbumschlag hervorzurufen. Des Weiteren wird in der Packungsanleitung darauf hingewiesen, dass das Wachstum von den Ansprüchen des jeweiligen Keimes abhängt. Somit könnten spezielle *S. agalactiae* Stämme unter Umständen nicht wachsen, keine charakteristischen Kolonien ausbilden oder keinen Farbumschlag verursachen. Für das GBS-Medium gibt es keine Hinweise auf einen Qualitätskontrollstamm in der Packungsbeilage. Da sich jedoch die Zusammensetzung des GBS-Mediums mit der Zusammensetzung der Granada™ Bouillon ähnelt, kann davon ausgegangen werden, dass hier unter Umständen ebenfalls der verwendete *S. agalactiae* Qualitätskontrollstamm keine rot-orangen Farbpigmente bilden kann.

6.2.2 Qualität der Nährmedien

Die Selektivität (siehe Tabelle 10) der Nährmedien war sehr unterschiedlich. Bei dem *Brilliance* GBS Agar kam es zu keinem weiteren Wachstum der getesteten Qualitätskontrollstämmen (Tabelle 10). Auch bei den Bouillons konnte kein Farbumschlag nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind sehr zufriedenstellend.

Dadurch kann erwartet werden, dass es zu einer Hemmung der getesteten Mikroorganismen auf diesen Medien kommt.

Die beiden Nährmedien CHROMagar™ StrepB und StrepB *Select* Agar weisen eine annähernd gleiche Selektivität auf. Bei beiden Medien kam es zu einem Wachstum von *Streptococcus pyogenes* in derselben Farbe wie bei B-Streptokokken. Bei dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* handelt es sich um grampositive Kokken, welche eine β -Hämolyse bildet und nach der Lancefield-Einteilung zu der Gruppe A gehören. Da es sehr dem Bakterium *Streptococcus agalactiae* ähnelt, ist eine genaue Differenzierung notwendig. Dies war bei beiden Medien nicht der Fall. Auch wurde der Keim *K. pneumoniae* auf beiden Nährmedien nicht gehemmt. Doch die Farbgebung der Kolonien von *K. pneumoniae* unterschieden sich stark von der Koloniefarbe von *S. agalactiae*. Als Ursache hierfür könnte die ähnliche Zusammensetzung beider Nährmedien zählen.

Auf dem Granada™ Agar wuchsen alle getesteten Mikroorganismen (siehe Tabelle 10). Alle Kolonien der Qualitätskontrollstämmen wuchsen weiß, sodass keine Unterscheidung getroffen werden konnte. Der Keim *S. agalactiae* sollte orange-rote Kolonien bilden, somit wäre eine Unterscheidung gegenüber anderen Keimen möglich. Aber bei der Ermittlung der Nachweisgrenze wurde festgestellt, dass der Qualitätskontrollstamm *S. agalactiae* auch in der Lage ist, weiß zu wachsen. Dies erschwert die Identifizierung erheblich. Laut Herstellerangaben sollte der Keim *E. coli* (ATCC 25922) nach 24 h Inkubation gehemmt werden. Dies konnte nicht bestätigt werden.

Die Sensitivität und Spezifität wurde unter der Zuhilfenahme der Tabelle 11 wie folgt berechnet:

Sensitivität

$$= \frac{\text{Anzahl richtig positiver Proben}}{(\text{Anzahl richtig positiver Proben} + \text{Anzahl falsch negativer Proben})}$$

Spezifität

$$= \frac{\text{Anzahl richtig negativer Proben}}{(\text{Anzahl richtig negativer Proben} + \text{Anzahl falsch positiver Proben})}$$

Tabelle 13: Sensitivität und Spezifität der festen chromogenen Nährmedien

Nährmedium	Sensitivität	Spezifität
CHROMagar™	87,5 %	100 %
Granada™ Agar	100 %	100 %
<i>Brilliance</i> GBS Agar	100 %	100 %
StrepB <i>Select</i> Agar	83,3 %	100 %

Für die festen chromogenen Nährmedien konnten hohe Sensitivitäten und Spezifitäten (100 % für alle Nährmedien) ermittelt werden (siehe Tabelle 13). Dabei unterscheiden sich nur die Sensitivitäten des CHROMagar™ StrepB (87,5 %) und des StrepB *Select* Agars (83,3 %). Die niedrigeren Sensitivitäten liegen an den nicht detektierten positiven Proben. Als Ursache dafür könnte eine zu niedrige Keimzahl in dem Primärmaterial sein.

Die ermittelte Sensitivität (83,3 %) des StrepB *Select* Agars stimmt in etwa mit der von Tazi *et al.* (2008) bestimmten Sensitivität überein. Tazi *et al.* (2008) ermittelten für dieses Nährmedium eine Sensitivität von 88,2% (nach 48 h Inkubation). Hierbei wurden die Abstriche in 500 µl NaCl [0,9%] gevortext und je 100 µl auf die zu testenden Medien (StrepB *Select* Agar (Bio-Rad), COS Agar (bioMérieux) und Granada Agar (bioMérieux)) aufgetragen. Die Sensitivitäten aller drei Nährmedien lagen nach 48 h bei 88,2 %. [Tazi *et al.*, 2008-B]

Bei der Arbeit von Smith *et al.* (2010) wurde eine selektive Bouillon für B-Streptokokken zur Voranreicherung verwendet. Dabei wurde der StrepB *Select* Agar (Bio-Rad), mit einer ermittelten Sensitivität von 98,6 %, getestet. Louie *et al.* (2010) lieferten eine ebenso hohe Sensitivität (98,8 %) nach Vorkultivierung für den StrepB *Select* Agar (Bio-Rad). [Louie *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010]

Es können die Abstriche jedoch auch vorangereichert werden, um die Sensitivitäten zu erhöhen. Bei Poisson *et al.* (2011) wurden die Vaginalabstriche von schwangeren Frauen in einer Todd-Hewitt-Bouillon (mit 15 µg/ml Nalidixinsäure und 10 µg/ml Colistin) für 24 h vorkultiviert und anschließend auf dem CHROMagar™ StrepB, dem COS- und CNA-Agar (bioMérieux) subkultiviert. Somit konnte eine Sensitivität von 92 % (nach 48 h) für den CHROMagar™ StrepB erreicht werden. In meiner Arbeit

konnte eine Sensitivität von 87,5 % für den CHROMagarTM StrepB erlangt werden. In der Arbeit von Poisson *et al.* (2011) sind die Sensitivitäten des COS- und CNA-Agars schlechter als die des CHROMagarTM StrepB. Der COS-Agar (Sensitivität: 58 %) lieferte zu viel Begleitflora, sodass eine genaue Identifizierung von *Streptococcus agalactiae* nur bedingt möglich war. Zu viele falsch negativ detektierte Proben waren der Grund für die niedrige Sensitivität (82 %) des CNA-Agars. Der CHROMagarTM StrepB detektierte keine falsch negativen Proben und konnte den oft auftretenden Keim *Enterococcus faecalis* durch blaue Kolonien eindeutig von den B-Streptokokken (malvenfarbig) abtrennen. [Poisson *et al.*, 2011]

Rosa-Fraile *et al.* testeten die Sensitivität eines Granada Mediums mit und ohne Vorkultivierung (Anreicherung in Todd-Hewitt-Bouillon). Dieses Granada Medium besitzt dieselbe Zusammensetzung wie das GranadaTM Medium von bioMérieux, nur wird dieses von einer anderen Firma (Biomedics, Madrid, Spanien) geliefert. Dabei wurden sowohl das feste Medium als auch die Bouillon untersucht. Es wurde eine Sensitivität von 96 % für das feste und flüssige Medium ohne Voranreicherung erlangt. Bei der Subkultivierung aus der Todd-Hewitt-Bouillon wurde eine niedrigere Sensitivität (89 %) für beide Medien erreicht. In dieser Arbeit wurde eine Sensitivität von 100 % erreicht. [Rosa-Fraile *et al.*, 1999]

Overman *et al.* (2002) ermittelten eine Sensitivität von nur 40,3 % für ein Granada Medium der Firma Hardy Diagnostics. Hierbei wurden die Vaginalabstriche nicht vorkultiviert, sondern direkt auf das Medium aufgetragen. Dennoch lieferte dieses Medium eine hohe Spezifität von 99,7 %. [Overman *et al.*, 2002]

Nach Clark & Scopes (2013) liegt die Sensitivität des *Brilliance* GBS Agars bei 94,4% und die Spezifität bei 99,4% [URL - 8]. Eine andere Arbeit lieferte eine Sensitivität von 97,4 % und eine Spezifität von 96,7 % bei direkter Ausplattierung auf dem *Brilliance* GBS Agar von Oxoid [URL - 13]. Diese Werte stimmen in etwa mit der in dieser Arbeit ermittelten Sensitivität (100 %) und Spezifität (100 %) überein. Bei einer Vorkultivierung in der Todd-Hewitt-Bouillon (mit Nalidixinsäure und Colistin) erreichte dieses Nährmedium eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 94 % [URL - 13].

Die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten stimmen ungefähr mit den in der Literatur gefundenen Werten überein. Für genauere Angaben sollte der Stichprobenumfang erhöht werden.

6.3 Vergleich der beiden Resistenztestungen

Die Resistenztestungen wurden mit dem VITEK 2-System und dem WalkAway-System durchgeführt. Beide Systeme zur Ermittlung von Resistenzen liefern gute Ergebnisse (siehe Tabelle 12), da die MHK-Interpretationen bei den einzelnen Proben übereinstimmen. Auch besteht kein Unterschied, ob das Koloniematerial von dem bluthaltigen Nährmedium entnommen wurde oder von den chromogenen Nährmedien.

Das VITEK 2-System lieferte eindeutige Ergebnisse. Im Durchschnitt dauerte die Analyse der Streptokokken 10 h. Diese guten Ergebnisse konnten auch Ligozzi *et al.* (2002) bestätigen. Ligozzi *et al.* (2002) haben die AST-P516 Resistenztestkarte mit dem Agardiffusionstest (Referenzmethode) für den Keim *S. agalactiae* verglichen. Diese Resistenzkarte eignet sich für Enterokokken und *Streptococcus agalactiae*. Die Ergebnisse des VITEK 2-Systems stimmten mit denen des Agardiffusionstest überein. [Ligozzi *et al.*, 2002]

In meinem 12-wöchigen Praxismodul habe ich das VITEK 2-System mit dem Agardiffusionstest verglichen. Es wurde die Resistenztestkarte AST-ST01 verwendet. Dabei konnte ich feststellen, dass das VITEK 2-System ein sehr empfindliches System ist, welches sich gut für die Routine einsetzen lässt.

Bei dem WalkAway-System stimmen die MHK-Interpretationen mit denen des VITEK 2-Systems überein. Dieses System eignet sich bedingt für die Routine, da häufig Fehlermeldungen („ungenügendes Wachstum“ oder „Übersprungene Testfelder“) auftraten. Kam es zu einer solchen Fehlermeldung, mussten die betroffenen Proben erneut getestet werden. Ein weiterer Kritikpunkt ist die fehlende Angabe zu der induzierten Clindamycinresistenz. Diese können nicht aus dem Antibiogramm abgelesen, sondern müssen gegebenenfalls mittels Agardiffusionstest nachgetestet werden.

Für diese Art von Untersuchung würde ich das VITEK 2-System empfehlen, da in der Packungsanleitung des WalkAway-Systems Folgendes geschrieben steht: „Bei *S. agalactiae* wurden mit MicroScan[®] MICroSTREP *plus*[®]-Panels, die mit dem WalkAway[®]-System gelesen wurden, eine falsche Empfindlichkeit und fälschlicherweise übersprungene Testfelder bemerkt. Bei *S. agalactiae*-Tests sollten die Panels manuell gelesen oder die Ergebnisse des WalkAway[®]-Systems visuell bestätigt werden.“

Dennoch lässt sich das WalkAway-System für andere Streptokokken-Arten gut einsetzen. Um bessere Ergebnisse erzielen zu können, könnten die Streptokokken in einem flüssigen Nährmedium vorkultiviert und erst danach beimpft werden. Dies ist aber nicht für die Routine geeignet.

6.4 Vorschlag zum Screening von β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B

In Bezug auf das bisherige Screening von β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B wurde diese Methode überarbeitet. Dabei könnte der chromogene *Brilliance* GBS Agar von Oxoid in die Laborroutine hinzugefügt werden (siehe Abbildung 12). Bisher wird der Vaginalabstrich auf dem TSS-Nährmedium (Vollmedium) komplett und auf dem CNA-Agar zur Hälfte ausgestrichen.

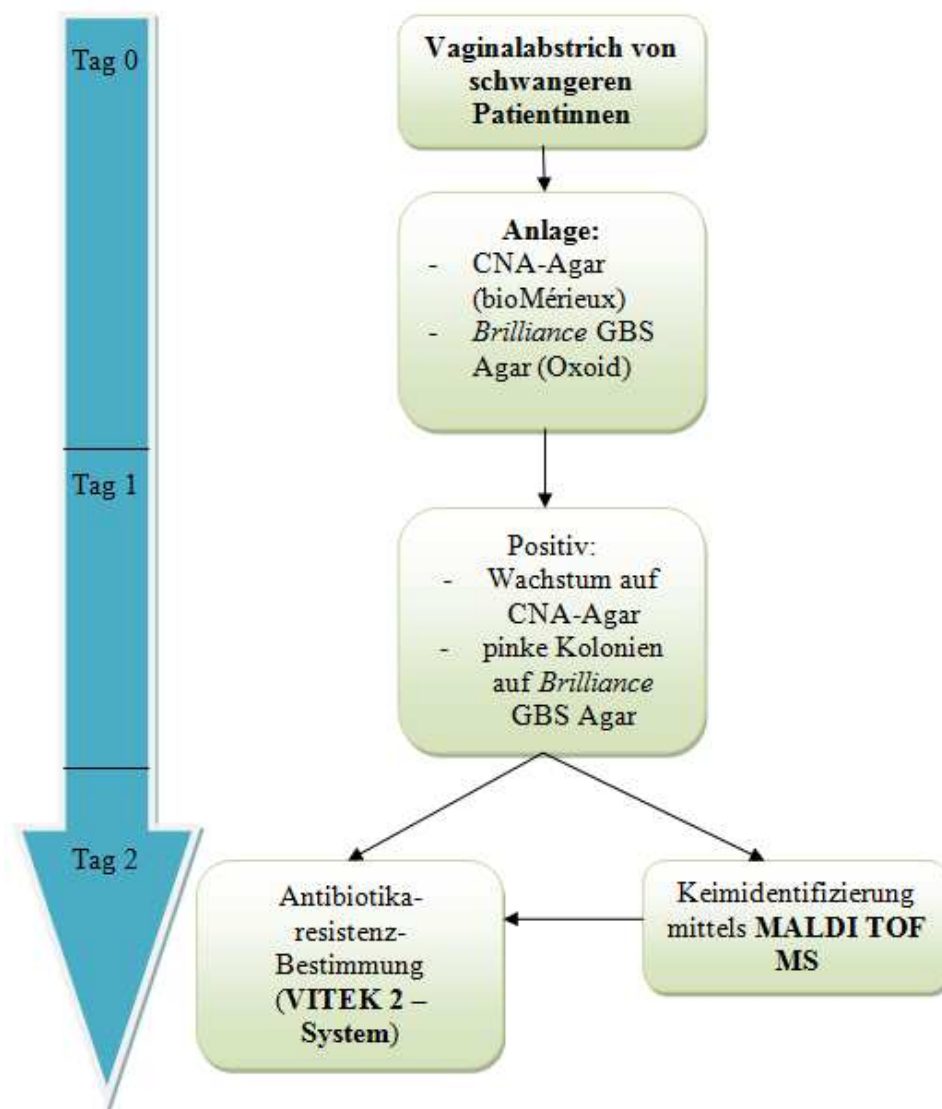


Abbildung 15: Vorschlag zum Arbeitsablauf bei Anforderung auf β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B

Bei der Anforderung auf β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B zur Mutterschaftsvorsorgeuntersuchung sollte der Vaginalabstrich einer schwangeren Patientin komplett auf dem CNA-Agar und zur Hälfte auf dem *Brilliance* GBS Agar ausgestrichen werden. Laut dem mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandard ist eine kulturelle Anzüchtung notwendig [MiQ 2011]. Dies kann jedoch sowohl auf einem Selektivagar als auch auf einem chromogenen Nährmedium geschehen [MiQ 2011]. Die Mutterschaftsrichtlinien schreiben für diese Art von Untersuchung nichts vor [URL - 14].

Die Leitlinie zur Prophylaxe der Neugeborenenensepsis rät zu einer mikrobiologischen Untersuchung auf GBS zwischen der 35. und 37. Schwangerschaftswoche. Die sicherste Methode stellt die bakteriologische Analyse dar. Dabei sollte ein antibiotikahaltiges Selektivnährmedium zur Kultivierung verwendet werden, um die Nachweisrate zu erhöhen. Der CNA-Agar entspricht diesen Kriterien. [URL - 15]

Nach der Übernachtinkubation (bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$) können, sowohl die pinken Kolonien auf dem *Brilliance* GBS Agar, als auch ein Wachstum von B-Streptokokken auf dem CNA-Agar, als positiv detektiert werden. Zur Überprüfung können entsprechende Kolonien (entweder von dem CNA-Agar oder dem *Brilliance* GBS Agar) mittels MALDI TOF MS kontrolliert werden.

Ist eine Resistenzbestimmung angezeigt, sollte diese mittels VITEK 2-System durchgeführt werden. Eine Resistenzbestimmung ist vor allem dann ratsam, wenn die Patientin eine Penicillinallergie besitzt, um die alternativen Antibiotika (Clindamycin und Cefazolin) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu testen [URL - 15].

7 Zusammenfassung und Ausblick

Vier chromogene Nährmedien (CHROMagar™ StrepB, Granada™ Agar, StrepB *Select* Agar und *Brilliance* GBS Agar) und ein bluthaltiger Selektivnährmedium (CNA-Agar) wurden zum Nachweis von β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B hinsichtlich ihrer Nachweisgrenze, Selektivität, Sensitivität und Spezifität untersucht. Folgende Nachweisgrenze wurde mittels *S. agalactiae* ATCC13813 ermittelt, ausgehend von einer Verdünnung mit McFarland 0,5:

CNA-Agar (10^{-7}) / StrepB *Select* Agar (10^{-7}) \rightarrow Granada™ Agar \rightarrow CHROMagar™ StrepB \rightarrow *Brilliance* GBS Agar (10^{-6}).

Insgesamt wurden mittels Referenzmethode (CNA-Agar) 316 Patientenproben auf β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B untersucht und 28 Proben konnten als positiv detektiert werden. Auf dem CHROMagar™ StrepB wurden 68 Proben ausgestrichen. Davon waren sieben positiv. Eine Probe lieferte ein falsch negatives Ergebnis. Der Granada™ Agar konnte eine von 47 Proben als positiv detektieren. Auf dem *Brilliance* GBS Agar konnten bei 15 von 29 Proben ein Wachstum von *Streptococcus agalactiae* nachgewiesen werden. Der StrepB *Select* Agar konnte 15 von 33 Proben als positiv detektieren. Jedoch lieferte dieses Nährmedium drei falsch negative Resultate.

Aufgrund der Nachweisgrenzen und der ermittelten Sensitivitäten/Spezifitäten, jeweils in Klammern dargestellt, ergab sich folgendes Ranking für die untersuchten Nährmedien:

CNA-Agar (100% / 100%) \rightarrow *Brilliance* GBS Agar (100% / 100%) \rightarrow CHROMagar™ StrepB (87,5% / 100%) \rightarrow StrepB *Select* Agar (83,3% / 100%) \rightarrow Granada™ Agar (100% / 100%).

Von den insgesamt 28 Proben mit positiven Nachweis auf *S. agalactiae* wurden die Antibiogramme sowohl mit dem VITEK 2-System (Resistenztestkarte: AST-ST01) als auch mit dem WalkAway-System (MICroSTREP *plus* Panel) erstellt. Beide Systeme

lieferten vergleichbare Resultate. Jedoch lieferte das VITEK 2-System schnellere Resultate inklusive der induzierten Clindamycin Resistenztestung.

Ausblick

Eine weitere Alternative zum Nachweis von β -hämolyisierenden Streptokokken wäre der chromID Strepto B Agar von bioMérieux. Dieser lieferte nach Tazi A. *et al.* (2008) eine Sensitivität von 94,1 % und eine Spezifität von 100 %. Außerdem wird angegeben, dass auf Grund der hohen Spezifität keine zusätzliche Identifizierung notwendig ist. [Tazi *et al.*, 2008-A]

Eine kulturunabhängige Methode ist der molekularbiologische Nachweis mittels PCR, z.B. von der Firma BD GeneOhm (UK) [Smith *et al.*, 2008].

Literaturverzeichnis

CLSI (2012): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. *CLSI document* M100-S20; URL: <<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>> (Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute)

EUCAST (2014): European committee on antimicrobial susceptibility testing - breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. URL: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf>

Fuchs B. (2012) Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1259: 62 - 73

Fuchs G.; Schlegel H. G.; Eitinger T.; Heider J.; Kemper B.; Kothe E.; Schink B.; Schneider E. & Uden G. (2007): *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage; Georg Thieme Verlag; Stuttgart

Ligozzi M.; Bernini C.; Bonora M. G.; de Fatima M.; Zuliani J. & Fontana R. (2002): Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci; *Journal of Clinical Microbiology*; 40 (5): 1681 – 1686

Louie L.; Kotowich L.; Meaney H.; Vearncombe M. & Simor A. E. (2010): Evaluation of a new chromogenic medium (StrepB Select) for detection of group B *Streptococcus* from vaginal-rectal specimens; *Journal of Clinical Microbiology*; 40 (12): 4602 - 4603

Neumeister B.; Geiss H. K.; Braun R. W. & Kimmig P. (2009): *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. 2. vollständig überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag; Stuttgart

MiQ 11a 2011 (Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards); Podbielski A.; Herrmann M.; Kniehl E.; Mauch H.; Rüssmann H.; 2. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München

Overman S. B.; Eley D. D.; Jacobs B. E. & Ribes J. A. (2002): Evaluation of methods to increase the sensitivity and timeliness of detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*; 40 (11): 4329 - 4331

Perry J. D. & Freydière A. M. (2007): The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*; 103: 2046 - 2055

Poisson D.-M.; Evrard M.-L.; Freneaux C.; Vivès M.-I. & Mesnard L. (2011): Evaluation of CHROMagar™ StrepB agar, an aerobic chromogenic medium for prepartum vaginal/rectal Group B *Streptococcus* screening. *Journal of Microbiological Methods*; 84 (3): 490 - 491

RiliBÄK (2013): Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. URL:
<http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/Rili-BAeK-Labor_092013.pdf>

Rosa-Fraile M.; Rodriguez-Granger J.; Cueto-Lopez M.; Sampedro A.; Gaye E. B.; Haro J. M. & Andreu A. (1999): Use of granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*; 37 (8): 2674 - 2677

Smith D.; Perry J.; Laine L.; Galloway A. & Gould F. K. (2008): Comparison of BD GeneOhm real-time polymerase chain reaction with chromogenic and conventional culture methods for detection of group B *streptococcus* in clinical samples. *Microbiology and Infectious Disease*; 61: 369 – 372

Smith N.S.; Henwick S.; Chow D.; Walz M. & Upshon K. (2010): Comparison of the rate of recovery of group B streptococci from genital specimens inoculated into group B selective broth and sub-cultured to neomycin nalidixic acid plates and three different chromogenic media; Dep of Microbiology BC Biomedical Laboratories Ltd, Surrey B.C. ASM General Meeting in San Diego. Poster 2010. ABSTRACT

Stille W.; Brodt, H.-R.; Groll A. H.; Just-Nübling G. (2013): Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antinfektiösen Behandlung. 11. Auflage; Stuttgart: Schattauer

Tazi A.; Doloy A.; Réglier-Poupet H.; Dautezac F.; Raymond J. & Poyart C. (2008-A): Comparative evaluation of Strepto B ID ® chromogenic medium and granada media for the detection of group B *streptococcus* from vaginal samples of pregnant women; Journal of Microbiological Methods; 73: 263 - 265

Tazi A.; Doloy A.; Réglier-Poupet H.; Hemet M.-E.; Raymond J. & Poyart C. (2008-B): Evaluation of the new chromogenic medium StrepB Select™ for screening of group B *Streptococcus* in pregnant women; Pathologie Biologie. 57: 225 - 228

URL - 1 (04.03.2014): CHROMagar™ StrepB; URL: <<http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-strepb-focus-on-streptococcus-agalactiae-30.html>>

URL - 2 (19.03.2014): Empfehlungen zur Prophylaxe perinatal erworbener Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Perinatale Medizin und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe; URL: <http://www.labor28.de/lab_mag/dez2005/streptokokken4.html>

URL - 3 (04.03.2014): Granada agar; URL: <<http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/12-granada-agar>>

URL - 4 (04.03.2014): Granada Biphasic broth; URL: <<http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/58-granada-biphasic-broth>>

URL - 5 (04.03.2014): Thermo Scientific™ *Brilliance*™ GBS Agar; URL: <http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO5320A>

URL - 6 (04.03.2014): StrepB Select; URL: < http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/cdg/literature/16403_B_StrepBSelect.pdf >

URL - 7 (04.03.2014): GBS-Medium und GBS-Agar; URL: < <http://www.medco.eu/strepb.php> >

URL - 8 (12.05.2014): Clark D. & Scopes E.: Thermo Scientific *Brilliance* GBS agar for group B streptococci screening. URL: <<http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Application%20&%20Technical%20Notes/Microbiology/Thermo-Scientific-Brilliance-GBS-Agar-For-Group-B-Streptococci-Screening-GLOBAL-LT2079-EN-low-res.pdf>>

URL - 9 (12.05.2014): Jorgensen J. H. & Ferraro M. J.: Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. URL: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/11/1749.full.pdf+html>>

URL - 10 (13.05.2014): Sung Ju Kim M. D.; Young Uh M. D.; In Ho Jang M. S.; Kwan Soo Lee M. T.; Soon Deok Park M. S. & Kap Jun Yoon M. D.: Evaluation of the MicroScan MICroSTREP Plus antimicrobial panel for testing β -hemolytic streptococci and viridans group streptococci URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3129350/>>

URL - 11 (13.05.2014): Tonolla M.; Benagli C.; Rossi V.; Fragoso C. & Petrini O. MALDI-TOF MS: a new laboratory option for the diagnosis of clinical infections: URL: <http://www.sulm.ch/pipette_magazin/files/pipette/2010-03/2010-03-087.PDF>

URL - 12 (13.05.2014): Signor L.; Erba E. B.; Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analysis of intact proteins larger than 100 kDa; URL: <<http://www.jove.com/video/50635/matrix-assisted-laser-desorptionionization-time-flight-maldi-tof-mass>>

URL - 13 (13.05.2014): Scopes E.; Mertes T.; Dörbecker C.; Kleemann P.; Meppen M. & Rausch C.: A comparative evaluation of *Brilliance* GBS agar and traditional media for the detection of group B streptococci from women undergoing GBS screening; URL: <<http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Application%20&%20Technical%20Notes/Microbiology/A-Comparative-Evaluation-Of-Brilliance-GBS-Agar-And-Traditional-Media-For-The-Detection-Of-Group-B-Streptococci-From-Women-Undergoing-GBS-Screening-LT2111-GLOBAL-EN-low-res.pdf>>

URL - 14 (13.05.2014): Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“). URL: <https://www.kvwl.de/arzt/recht/kbv/richtlinien/richtl_mutterschaft.pdf>

URL - 15 (14.05.2014): Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI), und Deutsche Gesellschaft für Perinatale Medizin (DGPM). URL: <http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-020l_S2k_Neugeborenensepsis_Streptokokken.pdf>

Anhang**Tabelle 14: Validation MICroSTREP plus Panel WalkAway**

	Antibiotikum	<i>S. pneumoniae</i>		<i>E. faecalis</i>	
		zulässiger MHK-Bereich [µg/ml]	ermittelter MHK- Bereich [µg/ml]	zulässiger MHK- Bereich [µg/ml]	ermittelter MHK- Bereich [µg/ml]
Tag 1	Amoxicillin/ Clavulansäure	≤ 1/0,5	≤ 1/0,5		
	Ampicillin	≤ 0,06 - 0,25	≤ 0,06		
	Azithromycin	≤ 0,12 - 0,25	≤ 0,12		
	Cefepim	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Cefotaxim	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Ceftriaxon	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Cefuroxim	≤ 0,25 - 1	≤ 0,25		
	Chloramphenicol	≤ 2 - 8	≤ 2		
	Clarithromycin	≤ 0,12	≤ 0,12		
	Clindamycin	≤ 0,06 - 0,12	≤ 0,06		
	Daptomycin	≤ 0,25 - 0,5	≤ 0,25		
	Erythromycin	≤ 0,06 - 0,12	≤ 0,06		
	Levofloxacin	≤ 0,5 - 2	1		
	Linezolid	≤ 1 - 2	≤ 1		
	Meropenem	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	≤ 0,5	≤ 0,5		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	≤ 0,25/4,7		
	Vancomycin	≤ 0,25 - 0,5	≤ 0,25		
Tag 2	Amoxicillin/ Clavulansäure	≤ 1/0,5	≤ 1/0,5		
	Ampicillin	≤ 0,06 - 0,25	≤ 0,06		
	Azithromycin	≤ 0,12 - 0,25	0,25		
	Cefepim	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Cefotaxim	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Ceftriaxon	≤ 0,25	≤ 0,25		
	Cefuroxim	≤ 0,25 - 1	≤ 0,25		
	Chloramphenicol	≤ 2 - 8	≤ 2		
	Clarithromycin	≤ 0,12	≤ 0,12		

	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 3	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 4	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		

	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 5	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		

	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
Tag 6	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 7	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		

	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 8	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 9	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		

	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 10	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		

Tag 11	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	0,12		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	> 2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 12	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		

	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 13	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 14	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		

	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 15	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 16	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		

	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 17	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		

	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 18	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 19	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		

	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
Tag 20	Amoxicillin/ Clavulansäure	$\leq 1/0,5$	$\leq 1/0,5$		
	Ampicillin	$\leq 0,06 - 0,25$	$\leq 0,06$		
	Azithromycin	$\leq 0,12 - 0,25$	$\leq 0,12$		
	Cefepim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefotaxim	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Ceftriaxon	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Cefuroxim	$\leq 0,25 - 1$	$\leq 0,25$		
	Chloramphenicol	$\leq 2 - 8$	≤ 2		
	Clarithromycin	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$		
	Clindamycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Daptomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		
	Erythromycin	$\leq 0,06 - 0,12$	$\leq 0,06$		
	Levofloxacin	$\leq 0,5 - 2$	$\leq 0,5$		
	Linezolid	$\leq 1 - 2$	≤ 1		
	Meropenem	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Minocyclin			1 -> 2	2
	Moxifloxacin	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$		
	Penicillin	0,25 - 1	0,25		
	Pristinamycin	≤ 1	≤ 1		
	Rifampin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$		
	Tetracyclin	≤ 1	≤ 1		
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,25/4,75 - 1/19	$\leq 0,25/4,7$		
	Vancomycin	$\leq 0,25 - 0,5$	$\leq 0,25$		

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde unabhängig von den Herstellerfirmen gefertigt, sowie die Beschaffenheitsentscheidung nicht von den Herstellern beeinflusst.

Mittweida, den 08.08.2014

Kristin Scharf